

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/62, 15/63, 15/67, 15/85, 15/86, C07K 14/82, A61K 31/70		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/30512 (43) Date de publication internationale: 3 octobre 1996 (03.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00477		(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 29 mars 1996 (29.03.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/03841 31 mars 1995 (31.03.95)		FR	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BRACCO, Laurent [FR/FR]; 12, rue Moulin-des-Prés, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFER, Fabien [FR/FR]; 53, boulevard de la Libération, F-94300 Vincennes (FR). TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 58, boulevard Saint-Denis, F-92400 Courbevoie (FR).			
(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).			

(54) Title: CONDITIONAL EXPRESSION SYSTEM

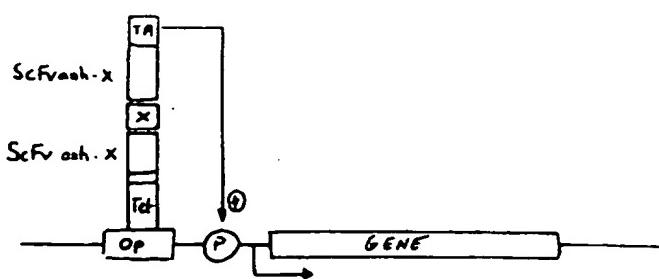
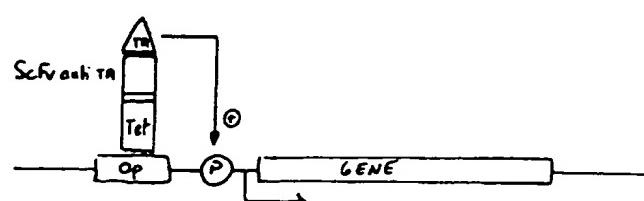
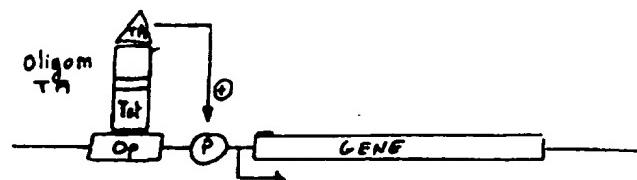
(54) Titre: SYSTEME D'EXPRESSION CONDITIONNEL

(57) Abstract

A novel conditional gene expression system particularly using the creation and expression of bispecific chimeric molecules including a domain capable of selectively binding a given DNA sequence and a sensing domain capable of specifically binding a transactivator or transrepressor or a transactivator or transrepressor complex.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un nouveau système conditionnel pour l'expression de gènes. Le système de l'invention est basé notamment sur la création et l'expression de molécules chimériques bispécifiques comprenant un domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN et un domaine détecteur capable de lier spécifiquement un transactivateur ou transrépresseur ou un complexe transactivateur ou transrépresseur.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

SYSTEME D'EXPRESSION CONDITIONNEL

La présente invention concerne un nouveau système pour l'expression conditionnelle de gènes. Elle concerne également l'utilisation de ce système en thérapie génique ou cellulaire, pour cibler de manière très sélective l'expression de gènes d'intérêt.

Les thérapies génique et cellulaire consistent à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit ex vivo dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme (thérapie cellulaire), soit directement in vivo dans le tissu approprié (thérapie génique). Différentes techniques existent pour effectuer le transfert de gènes, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des vecteurs chimiques ou biochimiques, naturels ou synthétiques tels que des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), lipides cationiques, etc. Une autre technique repose sur l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés et les adénovirus. L'une des difficultés majeures pour le développement de ces thérapies génique et cellulaire réside cependant dans la sélectivité du traitement. Selon les applications, selon le gène à transférer, il est important de pouvoir cibler certains tissus ou certaines parties seulement de l'organisme afin de concentrer l'effet thérapeutique et de limiter la dissémination et les effets secondaires. Ce ciblage peut être réalisé en

utilisant des vecteurs présentant une spécificité cellulaire donnée. Une autre approche consiste à utiliser des signaux d'expression spécifiques de certains types cellulaires. A cet égard, des promoteurs dits spécifiques ont été décrits dans la littérature, tels que le promoteur des gènes codant pour la pyruvate kinase, la villine, la GFAP, le promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras, le promoteur de l'actine α des cellules du muscle lisse, ou le promoteur des gènes de l'apo-AI, l'apo-AII, l'albumine humaine, etc. Cependant, ces promoteurs présentent certains inconvénients et en particulier ils présentent un certain bruit de fond transcriptionnel qui peut être gênant pour l'expression de gènes toxiques et ils sont limités à certaines cellules et ne peuvent donc être utilisés pour toute application.

La présente invention décrit maintenant un nouveau système d'expression conditionnel de gènes, particulièrement sélectif et efficace. Une des caractéristiques avantageuses du système de l'invention réside dans sa capacité à exprimer un gène non pas en fonction d'un type cellulaire, mais en fonction de la présence d'un élément cellulaire particulier ou d'une situation physiologique particulière. Ce système fait en effet appel à des molécules chimériques bispécifiques comprenant un domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN et un domaine détecteur capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur.

Un premier aspect de la présente invention réside plus particulièrement dans la création et l'expression de molécules chimériques bispécifiques comprenant un domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN et un domaine capable de lier spécifiquement un transactivateur ou transrépresseur ou un complexe transactivateur ou transrépresseur.

Un autre aspect de la présente invention réside dans une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule chimérique telle que définie ci-

avant, ainsi que tout un vecteur d'expression comprenant ladite séquence nucléique.

Un autre aspect de l'invention consiste en un système conditionnel d'expression de gènes comprenant (i) une molécule chimérique telle que définie ci-avant et (ii) une cassette d'expression comportant une séquence de régulation, un promoteur minimal (dont l'activité dépend de la présence d'un transactivateur) et ledit gène.

Un autre aspect de l'invention réside également dans un vecteur d'expression comprenant

- 10 - une séquence nucléique codant pour une molécule chimérique telle que définie ci-avant et -
- ladite cassette d'expression.

Le système d'expression conditionnel de l'invention est particulièrement approprié pour une utilisation en thérapie génique ou 15 cellulaire, pour cibler de manière très sélective l'expression de gènes d'intérêt.

L'une des composantes du système de l'invention consiste donc en des molécules chimériques bispécifiques particulières comprenant un domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN et un 20 domaine capable de lier spécifiquement un transactivateur ou un complexe transactivateur. La bispécificité des molécules de l'invention réside d'une part dans leur capacité à lier une séquence d'ADN définie (généralement désignée séquence régulatrice ou opérateur) et d'autre part dans leur capacité à recruter spécifiquement un domaine protéique transactivateur ou 25 transrépresseur permettant d'induire ou de réprimer l'expression de gènes.

L'invention porte particulièrement sur la mise au point de molécules chimériques bispécifiques permettant le recrutement de tout facteur transcriptionnel dont l'activation ou l'inactivation conduit à une situation

physiopathologique. Les molécules chimériques bispécifiques selon l'invention permettent ainsi le recrutement sélectif de transactivateurs transcriptionnels spécifiques d'un état physiopathologique, la fixation de ces facteur transcriptionnels à des promoteurs par l'intermédiaire d'une fixation de ces molécules à des séquences d'ADN définies localisées près de ces promoteurs (séquences régulatrices ou opérateur), et ainsi l'expression conditionnelle de gènes (Figure 1).

L'invention porte également sur la mise au point de molécules chimériques bispécifiques permettant le recrutement non pas d'une molécule portant un domaine transactivateur mais d'un complexe transactivateur transcriptionnel, c'est à dire d'un complexe formé entre une molécule cible présente dans une cellule et une molécule portant un domaine transactivateur (Figure 2). Dans ce cas, le complexe transactivateur est préférentiellement formé au moyen d'une deuxième molécule chimérique bispécifique comprenant un domaine transactivateur et un domaine de liaison sélectif à ladite molécule cellulaire. La fixation de cette deuxième molécule permet la formation d'un complexe binaire transactivateur transcriptionnel, lequel complexe étant alors recruté par le système détecteur de l'invention. La fixation de ce complexe ternaire à proximité de promoteurs permet ainsi l'expression régulée de gènes. Ce type de construction permet avantageusement d'élargir les conditions d'utilisation du système de l'invention à la détection de toute molécule intracellulaire dépourvue de domaine transactivateur, qu'il s'agisse d'une molécule endogène ou d'une molécule d'origine infectieuse par exemple.

Le système de l'invention permet ainsi, grâce à un système de détection très sélectif ("sensor") d'activer l'expression de gènes d'intérêt uniquement en présence de protéines cibles. Il peut s'agir de facteurs transcriptionnels apparaissant lors de situations physiologiques ou physiopathologiques, ou de toute molécule endogène ou d'origine infectieuse

par exemple. Le système de l'invention contient en effet un élément détecteur très sensible et très sélectif permettant de conditionner l'expression d'un gène à la présence, l'apparition ou la disparition de toute molécule dans une cellule.

5 Dans le cadre de la présente invention, le terme transactivateur désigne tout facteur transactivateur de la transcription ou toute protéine comportant un domaine transactivateur transcriptionnel. Le complexe transactivateur désigne le complexe formé entre une molécule présente dans une cellule et une molécule bispécifique de l'invention comprenant un
10 domaine transactivateur et un domaine de liaison spécifique à ladite molécule. Le système d'expression de l'invention peut être utilisé pour recruter toute protéine transactivatrice ou portant un domaine transactivateur, et en particulier toute protéine d'origine virale, parasitaire, mycobactérienne ou cellulaire possédant une activité transactivateur
15 transcriptionnel. Parmi les facteurs transcriptionnels d'origine virale on peut citer notamment la protéine Tat du virus VIH, les protéines E6/E7 du virus du papillome ou encore la protéine EBNA du virus d'Epstein Barr. Ces protéines possèdent un domaine transactivateur transcriptionnel et sont présentes uniquement dans les cellules infectées par ces virus, c'est-à-dire dans des
20 conditions physiopathologiques particulières. Le système d'expression conditionnel selon l'invention permet avantageusement une détection de cette situation physiologique (l'apparition de ces transactivateurs spécifiques de l'infection virale) et l'induction d'une expression sélective de gène(s) donné(s). Parmi les protéines cellulaires, on peut citer préférentiellement la
25 protéine p53 mutée ou sauvage. La protéine p53 est constituée de 393 acides aminés. Sous sa forme sauvage, elle est un suppresseur de tumeur capable de réguler négativement la croissance et la division cellulaire. Cette activité est liée à la présence d'un domaine transactivateur transcriptionnel dans la structure de la protéine p53, localisé dans la région N-terminale de la
30 protéine (résidus 1-100 environ). Dans certaines situations, p53 sauvage est

également capable d'induire l'apoptose (Yonish-Rouach et al., Nature, 352, 345-347, 1991). Ces propriétés se manifestant en situation de stress où l'intégrité de l'ADN cellulaire est menacée, p53 a été suggérée être un "gardien du génome". La présence de p53 mutées dans environ 40 % des tumeurs humaines, tous types confondus, renforce cette hypothèse et souligne le rôle probablement crucial que jouent les mutations de ce gène dans le développement tumoral (pour revues, voir Montenarh, Oncogene, 7, 1673-1680, 1992 ; Ören, FASEB J., 6, 3169-3176, 1992 ; Zambetti and Levine, FASEB J., 7, 855-865, 1993). Dans le cadre de la présente invention, il est possible de recruter sélectivement le domaine transactivateur de la protéine p53 et ainsi d'induire l'expression contrôlée de gène(s) uniquement dans les cellules contenant cette protéine. Il est particulièrement intéressant selon l'invention de recruter spécifiquement les formes mutées de la protéine p53 qui, comme indiqué ci-dessus, apparaissent dans des situations physiopathologiques d'hyperprolifération cellulaire (type cancer). Ce ciblage peut être réalisé préférentiellement au moyen d'un domaine de liaison spécifique aux formes mutées de la protéine p53. Il existe toutefois une spécificité de fait liée à l'accumulation des formes mutées qui possèdent une demi-vie très supérieure à la forme sauvage.

Le système de l'invention peut également être utilisé pour induire l'expression sélective de gène(s) par détection de toute molécule cible présente dans une cellule. La protéine détectée est préférentiellement une protéine apparaissant dans une cellule dans des situations anormales (infection, hyperprolifération, etc). Il peut s'agir en particulier de protéines virales telles que des protéines de structure ou de fonction d'un virus, et notamment du virus VIH, hépatite, herpès, etc. Il peut s'agir également de protéines spécifiques d'un état d'hyperprolifération cellulaire telles que notamment les protéines myc, fos, jun, les cyclines, etc.

L'une des propriétés des molécules chimériques de l'invention réside donc dans leur capacité à se lier à des régions spécifiques d'ADN (régions

régulatrices ou opérateur). Cette liaison permet d'apporter le domaine transactivateur à proximité du promoteur et de ce fait d'activer l'expression d'un gène placé sous contrôle dudit promoteur.

Le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN présent dans les molécules de l'invention est essentiellement d'origine protéique. Plus préférentiellement, ce domaine dérive d'une protéine procaryote ou eucaryote capable d'interagir avec des séquences d'ADN. De nombreuses études génétiques et structurales ont aujourd'hui permis de définir précisément, au sein de protéines interagissant avec des séquences d'ADN double brin, les domaines responsables de ces interactions.

10 Parmi les protéines procaryotes interagissant avec des séquences d'ADN double brin, on peut citer notamment des represseurs bactériens et, préférentiellement, le répresseur tetracycline d'E. Coli et le répresseur Cro du bactériophage Lambda.

15 Le represseur tetracycline (tetR) de E.coli est une protéine de 210 acides aminés environ. Chez E.coli, tetR contrôle négativement la transcription de gènes médiant la résistance à cet antibiotique au sein de l'opéron tet. En absence de tétracycline, le répresseur tetR se fixe à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique (désignée séquence opérateur ou Tetop) et réprime la transcription du gène de résistance. Au contraire, en présence de tétracycline, le répresseur tetR ne se fixe plus à l'opérateur tetop permettant une transcription constitutive du gène (Hillen.W and Wissmann.A. (1989) in Protein-Nucleic Acid Interaction. Topics in Molecular and Structural Biology.eds, Saenger.W. and Heinemann.U. (Macmillan, London), Vol.10. pp. 20 143-162). La séquence de tetR a été publiée (elle est reproduite notamment dans WO94/04682). La séquence d'ADN double brin spécifique de liaison de tetR à l'ADN (Tetop) est composée du motif suivant :

TCTCTATCACTGATAGGGA (SEQ ID n° 1).

30 Ce motif peut être répété plusieurs fois pour augmenter l'affinité et l'efficacité du système. Ainsi, La séquence régulatrice peut comprendre

jusqu'à 10 motifs et, de préférence, contient 2 motifs (Tetop2) ou 7 motifs (Tetop7) (voir Figure 3).

La protéine Cro a été définie à l'origine comme un régulateur de l'expression du répresseur CI (Eisen.H. et coll. (1970) PNAS 66, pp855). Le 5 clonage du gène cro a permis l'identification d'une protéine de 66 acides aminés (SEQ ID n° 21; Roberts;T et coll. (1977) Nature 270, pp274). Cro exerce son rôle physiologique en se fixant préférentiellement à l'opérateur OR3 de Lambda.

La séquence d'ADN double brin spécifique de liaison de Cro à l'ADN (région 10 désignée OR3) est composée des bases suivantes :

TATCACCGCAAGGGATA (SEQ ID n° 2)

Cette région peut également être répétée plusieurs fois pour augmenter l'affinité et l'efficacité du système (voir Figure 4).

Parmi les protéines eucaryotes interagissant avec des séquences 15 d'ADN double brin, on préfère utiliser pour la construction des molécules de l'invention les protéines ou domaines dérivés des protéines STAT, p53 ou NFkB (Inoue et al., PNAS 89 (1992) 4333). Concernant la protéine p53, son domaine de liaison à l'ADN est localisé dans la région centrale de la protéine et, plus précisément, dans la région comprise entre les acides aminés 102 à 20 292 (Pavletich et al., Genes & Dev. 7 (1993) 2556).

Comme indiqué ci-dessus, le domaine capable de lier sélectivement une 25 séquence définie d'ADN présent dans les molécules de l'invention est préférentiellement dérivé d'une protéine procaryote ou eucaryote capable d'interagir avec une région d'ADN double-brin. Le domaine utilisé pour la construction des molécules de l'invention peut être constitué de l'ensemble de la protéine ou d'un fragment de celle-ci comportant la région d'interaction avec l'ADN. Ce domaine a été identifié pour différentes protéines et notamment TetR (voir par exemple Berens et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 30 1945). Il peut également être constitué d'un dérivé de cette protéine ou du

fragment ayant conservé les propriétés de liaison à l'ADN. De tels dérivés sont notamment des protéines présentant des modifications d'un ou plusieurs acides aminés, par exemple pour permettre leur fusion avec les autres domaines des molécules de l'invention, préparées selon les techniques classiques de la biologie moléculaire. Des dérivés des protéines TetR et Cro par exemple ont été décrits dans la littérature, possédant des mutations ponctuelles et/ou des délétions (Hecht et al., J. Bact. 175 (1993) p. 1206; Altschmied et al., EMBO J 7 (1988) 4011; Baumeister et al., Proteins 14 (1992) 168; Hansen et al., J. Biol. Chem. 262 (1987) 14030). La capacité de liaison de ces dérivés à une séquence définie d'ADN peut ensuite être testée par incubation du dérivé préparé avec la séquence régulatrice et détection des complexes formés. En outre, les dérivés peuvent également être des protéines ayant des propriétés améliorées de liaison à l'ADN (spécificité, affinité, etc).

15

Selon un mode préféré de mise en oeuvre, le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN présent dans les molécules de l'invention est dérivé d'une protéine procaryote. Ce type de construction est particulièrement avantageux puisque ces protéines, d'origine non-humaine, reconnaissent des sites d'ADN double brin d'au moins 14 nucléotides. La probabilité de trouver la même séquence au sein du génome humain est quasi nulle et donc le système d'expression obtenu est d'autant plus sélectif.

Dans un mode de réalisation préféré, le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN présent dans les molécules de l'invention est dérivé des protéines tetR ou Cro. Il est tout particulièrement avantageux d'utiliser les protéines tetR ou Cro (SEQ ID n° 21) complètes.

Le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur transcriptionnel ou le complexe transactivateur transcriptionnel présent dans les molécules de l'invention peut être de différents types. Il peut s'agir en particulier d'un domaine d'oligomérisation dans le cas où le transactivateur

ou le complexe transactivateur ciblé comporte également un tel domaine. Il peut également s'agir de tout domaine synthétique ou naturel connu pour interagir avec l'édit transactivateur ou complexe transactivateur. Il peut encore s'agir d'un anticorps ou d'un fragment ou dérivé d'un anticorps dirigé contre le transactivateur ou complexe transactivateur.

Parmi les domaines d'oligomérisation utilisables dans le cadre de l'invention on peut citer plus particulièrement les leucine-zipper, les domaines SH2 ou les domaines SH3 par exemple. Les leucine-zipper sont des hélices α amphipatiques qui contiennent 4 ou 5 leucines tous les 7 acides aminés.

Cette périodicité permet la localisation des leucines à peu près à la même position sur l'hélice α . La dimérisation est sous tendue par des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales des leucines de deux domaines zipper contigus (Vogt et al., Trends In Bioch. Science 14 (1989) 172). Les domaines SH2 sont connus pour interagir avec des séquences peptidiques spécifiques phosphorylées en tyrosine. Les domaines SH3 peuvent être utilisés pour former un oligomère avec tout transactivateur ou complexe transactivateur comportant le peptide riche en proline correspondant (Pawson et al., Current Biology 3 (1993) 434). On peut également utiliser des régions de protéines connues pour induire une oligomérisation, telles que notamment la région C-terminale de la protéine p53. L'utilisation de cette région permet de recruter de manière sélective les protéines p53 présentes dans une cellule. On utilise préférentiellement dans le cadre de l'invention une région de p53 comprise entre les acides aminés 320-393 (SEQ ID n° 3), 302-360 ou 302-390.

Parmi les domaines synthétiques ou naturels connus pour interagir avec la molécule comportant l'élément transactivateur ciblé, on peut citer par exemple la région de la protéine MDM2 interagissant avec la protéine p53. Ce type de construction permet ainsi de recruter comme transactivateur la protéine p53 sauvage ou mutée.

Un domaine de liaison spécifique au transactivateur transcriptionnel préféré de l'invention est constitué par un anticorps ou un fragment ou dérivé d'anticorps. Les fragments ou dérivés d'anticorps sont par exemple les fragments Fab ou F(ab)'2, les régions VH ou VL d'un anticorps ou encore des anticorps simple chaîne (ScFv) comprenant une région VH liée à une région VL par un bras. Ce type de domaine est particulièrement avantageux puisqu'il peut être dirigé contre toute molécule.

Les anticorps, molécules de la super-famille des immunoglobulines, sont constitués de différentes chaînes (2 lourdes (H) et 2 légères (L)) elles 10 mêmes composées de différents domaines (domaine variable (V) domaine de jonction (J), etc). Le domaine de liaison au transactivateur ou complexe transactivateur présent dans les molécules de l'invention est avantageusement constitué d'un fragment ou dérivé d'anticorps comprenant au moins le site de liaison de l'antigène. Ce fragment peut être soit le 15 domaine variable d'une chaîne légère (V_L) ou lourde (V_H), éventuellement sous forme de fragment Fab ou F(ab)'2 ou, préférentiellement, sous forme d'anticorps simple chaîne (ScFv). Les anticorps simple chaîne utilisés pour la construction des molécules de l'invention sont constitués d'un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un 20 anticorps relié par un bras peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps. La construction de séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps modifiés selon l'invention a été décrite par exemple dans le brevet US4,946,778 ou dans les demandes WO94/02610, WO94/29446. Elle est 25 illustrée dans les exemples.

Une construction préférée selon la présente invention comprend un domaine de liaison à une protéine p53. Il s'agit plus préférentiellement d'un dérivé d'anticorps dirigé contre une protéine p53. Un mode de réalisation particulier est constitué par un anticorps simple chaîne dirigé contre p53. A

titre d'exemple particulier, on utilise le ScFv de séquence SEQ ID n° 4 dont la construction est décrite dans les exemples.

Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au transactivateur sont généralement reliés entre eux par l'intermédiaire d'un bras. Ce bras est généralement constitué d'un peptide conférant une flexibilité suffisante pour que les deux domaines des molécules de l'invention puissent être fonctionnels de manière autonome. Ce peptide est généralement composé d'acides aminés non chargés, n'interférant pas avec l'activité des molécules de l'invention, tels que par exemple la glycine, la serine, le tryptophane, la lysine ou la proline. Le bras comprend généralement de 5 à 30 acides aminés et, de préférence, de 5 à 20 acides aminés. Des exemples de bras peptidiques utilisables pour la construction des molécules de l'invention sont par exemple :

- GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID n° 5)
- 15 - PKPSTPPGSS (SEQ ID n° 6) dont la séquence codante est CCCAAGCCCCAGTACCCCCCCCAGGTTCTTCA (SEQ ID n° 6).

Des exemples préférés de molécule selon l'invention sont notamment les molécules suivantes :

- a) ScFv-tag-Hinge-TET ou Cro (Figure 5A)
- 20 Ce type de molécule comporte :
 - un domaine de liaison à un transactivateur constitué d'un anticorps simple chaîne,
 - une séquence peptidique tag reconnue par un anticorps monoclonal permettant la détection immunologique de la molécule. Cette séquence peut être par exemple l'épitope VSV de séquence MNRLGK (SEQ ID n° 7) dont la séquence codante est ATGAACC GGCTGGGCAAG (SEQ ID n° 7), ou l'épitope myc de séquence EQKLISEEDLN (SEQ ID n° 8) dont la séquence codante est GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT (SEQ ID n° 8), reconnu par l'anticorps 9E10.

- un bras peptidique de séquence SEQ ID n° 6 (Hinge) et
- un domaine de liaison à l'ADN constitué de la protéine TET ou Cro.

Préférentiellement, le ScFv est dirigé contre une protéine p53.

b) ScFv-Hinge-TET ou Cro (Figure 5B)

5 Ce type de molécule comporte les mêmes éléments que la molécule
a) à l'exception de la séquence tag qui est absente.

c) ScFv-TET ou Cro (Figure 5C)

10 Ce type de molécule comporte simplement un domaine de liaison à
un transactivateur constitué d'un anticorps simple chaîne et un domaine de
liaison à l'ADN constitué de la protéine TET ou Cro. Il ne comporte ni bras, ni
séquence tag. Dans cette construction, le domaine de liaison au
transactivateur est localisé dans la partie N-terminale de la molécule et le
domaine de liaison à l'ADN dans la partie C-terminale.

d) TET ou Cro-ScFv (Figure 5D)

15 Ce type de molécule est similaire au type c) ci-dessus. La différence
réside essentiellement dans l'agencement des domaines : le domaine de
liaison au transactivateur est maintenant localisé dans la partie C-terminale
de la molécule et le domaine de liaison à l'ADN dans la partie N-terminale.

e) TET ou Cro-Hinge-ScFv (Figure 5E)

20 Ce type de molécule comporte les mêmes éléments que la molécule
b) ci-dessus. La différence réside essentiellement dans l'agencement des
domaines : le domaine de liaison au transactivateur est maintenant localisé
dans la partie C-terminale de la molécule et le domaine de liaison à l'ADN
dans la partie N-terminale.

f) Oligom-tag-Hinge-TET ou Cro (Figure 5A)

25 Ce type de molécule est semblable au type a), à l'exception du
domaine de liaison au transactivateur qui est remplacé par le domaine
d'oligomérisation à la protéine p53 de séquence SEQ ID n° 3. Cette molécule
permet de recruter les protéines p53 mutées apparaissant dans les cellules
30 tumorales.

g) Oligom-Hinge-TET ou Cro (Figure 5B)

Ce type de molécule est semblable au type b), à l'exception du domaine de liaison au transactivateur qui est remplacé par le domaine d'oligomérisation à la protéine p53 de séquence SEQ ID n° 3.

5 h) Oligom-TET ou Cro (Figure 5C)

Ce type de molécule est semblable au type c), à l'exception du domaine de liaison au transactivateur qui est remplacé par le domaine d'oligomérisation à la protéine p53 de séquence SEQ ID n° 3.

i) TET ou Cro-Oligom (Figure 5D)

10 Ce type de molécule est semblable au type d), à l'exception du domaine de liaison au transactivateur qui est remplacé par le domaine d'oligomérisation à la protéine p53 de séquence SEQ ID n° 3.

j) TET ou Cro-Hinge-Oligom (Figure 5E)

15 Ce type de molécule est semblable au type e), à l'exception du domaine de liaison au transactivateur qui est remplacé par le domaine d'oligomérisation à la protéine p53 de séquence SEQ ID n° 3.

Par ailleurs, dans chacune de ces molécules, le bras peptidique peut être aisément remplacé par la séquence (G4S)3 (SEQ ID n° 5).

Un autre objet de la présente invention réside dans une séquence
20 d'acide nucléique codant pour une molécule chimérique telle que définie ci-
avant. Il s'agit avantageusement d'une séquence d'ADN, notamment d'ADNc.
Il peut également s'agir d'un ARN. Les séquences de l'invention sont
généralement construites par assemblage, au sein d'un vecteur de clonage,
des séquences codant pour les différents domaines selon les techniques
25 classiques de la biologie moléculaire. Les séquences d'acides nucléiques de
l'invention peuvent éventuellement être modifiées par voie chimique,
enzymatique ou génétique, en vue de générer des domaines stabilisés, et/ou
multifonctionnels, et/ou de taille réduite, et/ou dans le but de favoriser leur
localisation dans tel ou tel compartiment intracellulaire. Ainsi, les séquences
30 d'acides nucléiques de l'invention peuvent comprendre des séquences

codant pour des peptides de localisation nucléaire (NLS). En particulier, il est possible de fusionner les séquences de l'invention avec la séquence codant pour le NLS du virus SV40, dont la séquence peptidique est la suivante : PKKKRKV (SEQ ID n° 9) (Kalderon et al, Cell 39 (1984) 499).

5 Les séquences nucléiques selon l'invention font avantageusement partie d'un vecteur d'expression, qui peut être de nature plasmidique ou virale.

Un autre objet de la présente invention réside dans une protéine de fusion comprenant un domaine transactivateur transcriptionnel et un domaine 10 de liaison spécifique à une molécule donnée, éventuellement reliés par un bras peptidique, ainsi que toute séquence d'acide nucléique codant pour une telle fusion. Le domaine transactivateur peut être issu de toute protéine transactivateur transcriptionnel, tel que p53, VP16, EBNA, E6/E7, Tat, etc.

15 Un autre objet de l'invention consiste en un système conditionnel d'expression de gènes comprenant :

- une molécule chimérique telle que définie ci-dessus et
- une cassette d'expression comportant une séquence régulatrice, un promoteur transcriptionnel minimal et ledit gène.

La cassette d'expression contient les éléments nécessaires à 20 l'activation de l'expression du gène par le transactivateur ou complexe transactivateur recruté par la molécule bispécifique. Ainsi, la séquence régulatrice est la séquence de liaison à l'ADN de la molécule chimérique exprimée. Lorsque le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de TetR, la séquence régulatrice comprend 25 la séquence SEQ ID n° 1 ou un dérivé de celle-ci, éventuellement répétée plusieurs fois. Il s'agit préférentiellement de la séquence op2 (comportant 2 motifs Tetop répétés) ou Op7 (comportant 7 motifs Tetop répétés telle que

décrise par exemple dans Weinmann et al., *The Plant Journal* 5 (1994) 559). De même, lorsque le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de Cro, la séquence régulatrice comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou un dérivé de celle-ci, éventuellement répétée 5 plusieurs fois. Il s'agit préférentiellement de la séquence OR3. Les dérivés des séquences SEQ ID n° 1 et 2 peuvent être toute séquence obtenue par modification de nature génétique (mutation, délétion, addition, répétition, etc) et conservant la capacité de lier spécifiquement une protéine. De tels dérivés ont été décrits dans la littérature (Baumeister et al précitée, Tovar et al., Mol. 10 Gen. Genet. 215 (1988) 76, WO94/04672).

Concernant le promoteur transcriptionnel minimal, il s'agit d'un promoteur dont l'activité dépend de la présence d'un transactivateur. De ce fait, en l'absence de la molécule chimérique, le promoteur est inactif et le gène n'est pas ou peu exprimé. En revanche, en présence de la molécule 15 chimérique, le transactivateur ou complexe transactivateur recruté permet d'induire l'activité du promoteur minimal et ainsi l'expression du gène d'intérêt. Le promoteur minimal est constitué généralement d'une boite TATA ou INR. Ces éléments sont en effet les éléments minimum nécessaires à l'expression d'un gène en présence d'un transactivateur. Le promoteur 20 minimal peut être préparé à partir de tout promoteur par modification génétique. A titre d'exemple préféré de promoteur candidat on peut citer le promoteur du gène de la thymidine kinase. Des résultats intéressants ont plus précisément été obtenus avec un promoteur minimal dérivant du promoteur TK composé des nucléotides -37 à +19. Le promoteur minimal 25 peut également dériver du CMV humain. En particulier, il peut être constitué du fragment compris entre les nucléotides -53 à +75 ou -31 à +75 du CMV. Tout promoteur conventionnel peut toutefois être utilisé tel que par exemple le promoteur des gènes codant pour la chloramphénicol acétyle transférase, la β-galactosidase ou encore la luciférase.

La cassette d'expression est avantageusement constituée des éléments suivants :

- Comme séquence régulatrice, une séquence comprenant la séquence SEQ ID n° 1 ou 2 ou un dérivé de celles-ci, éventuellement 5 répétée plusieurs fois,

- Comme promoteur minimal, un promoteur dérivé du promoteur du gène de la thymidine kinase (TK),

- une séquence codante d'intérêt.

Encore plus préférentiellement, le promoteur minimal est constitué de 10 la région -37 à +19 du promoteur du gène de la thymidine kinase.

Avantageusement, la cassette d'expression est choisie parmi les cassettes de structure Tetop2.TK-Gène; Tetop7.TK-Gène et OR3.TK-Gène.

Un autre aspect de l'invention réside dans un vecteur d'expression 15 comprenant une séquence d'acides nucléique codant pour une molécule chimérique et une cassette d'expression telles que définies ci-avant. Dans les vecteurs de l'invention, la séquence d'acides nucléiques codant pour la molécule chimérique et la cassette d'expression peuvent être insérées dans la même orientation ou dans les orientations opposées. Par ailleurs, le vecteur peut être de nature plasmidique ou virale.

20 Parmi les vecteurs viraux, on peut citer plus préférentiellement les adénovirus, les rétrovirus, les virus de l'herpès ou encore les virus adéno associés. Les virus selon la présente invention sont défectifs, c'est-à-dire incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la 25 présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réPLICATION dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les séquences de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les

séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été 5 caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, 10 (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des 15 adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, le génome des adénovirus recombinants de l'invention comprend au moins les ITR et la région d'encapsidation d'un adénovirus, et la séquence d'acides nucléiques codant pour une molécule chimérique et une cassette d'expression telles que définies ci-dessus. Plus 20 préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution (par exemple par les séquences de l'invention), délétion partielle, ou addition d'une ou 25 plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues *in vitro* (sur de l'ADN isolé) ou *in situ*, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO 95/02697), E2 (WO 94/28938),

E4 (WO 94/28152, WO 94/12649, WO 95/02697) et L5 (WO 95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérées la région E4 et les séquences de l'invention (Cf FR 94 13355).

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre les séquences d'ADN de l'invention (séquence codant pour la molécule chimérique + cassette d'expression). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de complémenter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de complémenter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des

cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le 5 génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réPLICATION pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le 10 gène rep impliqué dans la réPLICATION virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment 15 WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont déletés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV 20 recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant les séquences nucléiques de l'invention (séquence codant pour la molécule chimérique + cassette d'expression) bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir 30 notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242,

EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc.

En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et les séquences de l'invention (séquence codant pour la molécule chimérique + cassette d'expression) est généralement construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987)

1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Un exemple de construction d'un virus recombinant défectif selon l'invention (réetrovirus) est décrit sur la figure 8. Cette figure souligne un deuxième avantage des constructions selon l'invention qui réside dans l'absence d'expression du gène d'intérêt dans les lignées d'encapsidation. Ces lignées étant dépourvues du transactivateur ou complexe transactivateur recruté par le système de l'invention, le promoteur est inactif et le gène n'est pas exprimé dans la cellule de production (figure 8A). Ce n'est que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule cible, c'est-à-dire une cellule dans laquelle est présent le transactivateur ou complexe transactivateur recruté par le système de l'invention, que le gène est effectivement exprimé (Figure 8B). Ceci est particulièrement avantageux pour la construction de virus contenant des gènes dont l'expression serait toxique pour les cellules (gènes Grb3-3, IL-2, Toxine diphtérique, etc).

Pour la mise en œuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

Différents types de vecteurs non-viraux peuvent également être utilisés dans le cadre de l'invention. Le système d'expression conditionnel selon l'invention peut en effet être incorporé dans un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer.

Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transférer et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques.

Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine, (LKLK)_n, (LKKL)_n, polyéthylène immine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants sont les plus avantageux. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, etc) et différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc). Plus récemment, il a été développé le concept de la transfection ciblée, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit.

La présente invention a également pour objet toute composition pharmaceutique comprenant un vecteur tel que défini ci-dessus. Ces compositions peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, la composition selon l'invention contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou

de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de serum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. S'agissant des rétrovirus, ils peuvent être avantageux d'utiliser directement les cellules d'encapsidation ou des cellules infectées ex vivo en vue de leur réimplantation in vivo, éventuellement sous forme de néo-organes (WO 94/24298).

Les doses de vecteur utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml. Pour les AAV et les adénovirus, des doses de 10^6 à 10^{10} pfu/ml peuvent également être utilisées. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une suspension de virions, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

20

Le système d'expression selon l'invention et les vecteurs correspondants sont particulièrement utiles pour contrôler l'expression de gènes d'intérêt dans le cadre de thérapies cellulaire ou génique. Ils peuvent ainsi être utilisés pour contrôler l'expression de toute séquence codante d'intérêt, et notamment d'une séquence codant pour un produit thérapeutique, qu'il s'agisse d'un peptide, polypeptide, protéine, acide ribonucléiques, etc. Plus particulièrement, le gène est une séquence d'ADN (ADNc, ADNg, ADN synthétique, humain, animal, végétal, etc) codant pour un produit protéique tel que des enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF,

etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), un ARN ligand (WO91/19813) etc.

Le gène d'intérêt peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308.

La présente invention est particulièrement adaptée à l'expression de séquences codant pour des facteurs toxiques. Il peut s'agir en particulier de poisons pour les cellules (toxine diphtérique, toxine pseudomonas, ricine A, etc) de produit induisant une sensibilité à un agent externe (gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc) ou encore de gènes tueurs capables d'induire la mort cellulaire (Grb3-3 (PCT/FR94/00542), ScFv anti-ras (WO94/29446), etc). Le système de l'invention permet en effet de produire des vecteurs notamment viraux contenant ces séquences sans toxicité pour les cellules de production, puis ensuite d'induire l'expression de ces molécules toxiques sélectivement dans des cellules cibles présentant le transactivateur ou complexe transactivateur désiré. Ce type de construction est donc particulièrement adapté à des stratégies de thérapies antitumorales par exemple, dans lesquelles l'objectif est de détruire sélectivement les cellules affectées. Ce système est également particulièrement intéressant

pour l'expression de cytokines, interférons, TNF ou TGF par exemple, dont une production incontrôlée peut avoir des effets secondaires très marqués.

La présente demande sera décrite plus en détail à l'aide des 5 exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des Figures

Figure 1: Représentation du système d'expression conditionnel selon l'invention permettant le recrutement sélectif d'un transactivateur au moyen 10 d'un domaine d'oligomérisation (A) ou d'un ScFv (B).

Figure 2: Représentation du système d'expression conditionnel selon l'invention permettant le recrutement sélectif d'un complexe transactivateur.

Figure 3: Représentation d'une cassette d'expression selon l'invention comportant une séquence régulatrice Tetop7, un promoteur minimal (boite 15 TATA) et un gène (CAT).

Figure 4: Représentation d'une cassette d'expression selon l'invention comportant une séquence régulatrice OR3, un promoteur minimal (boite TATA) et un gène (CAT).

Figure 5: Représentation de molécules chimériques bispécifiques selon 20 l'invention.

Figure 6: Construction de séquences d'ADN codant pour des molécules chimériques bispécifiques selon l'invention.

Figure 7: Représentation de constructions chimériques contrôle.

Figure 8: Structure et fonctionnement d'un vecteur viral (rétrorétrovirus) selon 25 l'invention.

Figure 9: Etude de l'interaction entre les molécules hybrides de l'invention et une séquence régulatrice.

Figure 10: Etude de l'interaction entre les molécules hybrides de l'invention et différentes formes de la protéine p53.

Figure 11: Mise en évidence de l'activation de la cassette Tet-Luc dans les cellules SAOS-2.

Figure 12: Mise en évidence de l'activation de la cassette Tet-Luc dans les cellules H358.

5 Techniques générales de Biologie Moléculaire

Les méthodes classiques de biologie moléculaires telles que la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium, les digestions par les enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, la transformation dans E.coli, la précipitation des acides nucléiques etc,

10 sont décrites dans la littérature (Maniatis et al., 1989).

Les enzymes ont été fournies par New-England Biolabs (Beverly, MA). Pour les ligatures les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des gels d'agarose de 0,8 à 1,5 %, purifiés par GeneClean (BIO101, LaJolla CA) et incubés de nuit à 14°C dans un tampon Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4.

15

L'amplification par PCR, (Polymerase Chain Reaction), a également été réalisée selon Maniatis et al., 1989, avec les spécifications suivantes :

- Concentration en MgCl₂ portée à 8mM.
- Température de dénaturation 95°C, température d'hybridation 55°C,

20

- température d'allongement 72°C. Ce cycle a été répété 25 fois dans un PE9600 Thermalcycler (Perkin Elmer, Norwalk CO).

Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en β par un groupement cyanoéthyl, (Sinha et al., 1984, Giles 1985), avec le synthétiseur automatique d'ADN Applied Biosystem modèle 394, (Applied Biosystem, Foster City CA), selon les recommandations du fabricant.

25

Le séquencage a été effectué sur des matrices double-brin par la méthode de terminaison de chaînes en utilisant des amores fluorescentes. Nous avons utilisé le kit de séquencage Taq Dye Primer Kit de chez Applied

Biosystem (Applied Biosystem, Foster City CA) selon les spécifications du fabricant.

Exemples

5 Exemple 1 : Construction de cassettes d'expression comportant une séquence de régulation, un promoteur transcriptionnel minimal et un gène.

1.1. Construction du plasmide pTETop7/CAT

Le plasmide pTETop7/CAT contient les éléments suivants (Figure 3) :

- Une séquence de régulation constituée d'une séquence d'interaction avec le répresseur tétracycline tetR composée de 7 motifs Tetop (SEQ ID 10 n° 1) répétés ;

- un promoteur minimal dérivé du promoteur du gène de la thymidine kinase (région -37 à + 19 portant la boite TATA) ;

- la séquence codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous contrôle dudit promoteur minimal.

15 Ce plasmide a été construit par clonage du fragment SmaI-BglII du plasmide pUHD10-7 (WO 94/29442) dans le plasmide pKK232-8 (Pharmacia) préalablement digéré par SmaI et BamHI.

1.2. Construction du plasmide pOR3/CAT

20 Le plasmide pOR3/CAT contient les éléments suivants (Figure 4) :

- Une séquence de régulation constituée d'une séquence OR3 d'interaction avec le répresseur Cro (SEQ ID n° 2) ;

- un promoteur minimal dérivé du promoteur du gène de la thymidine kinase (région -37 à + 19 portant la boite TATA);

25 - la séquence codant pour la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous contrôle dudit promoteur minimal.

Ce plasmide a été construit de la manière suivante : La séquence OR3 d'interaction avec le répresseur Cro a été synthétisée artificiellement. Pour cela, les deux oligonucléotides suivants ont été synthétisés :

Oligo 5533 (SEQ ID n° 22) : 5'-GATCCTATCACCGCAAGGGATAA-3'

Oligo 5534 (SEQ ID n° 23) : 3'-GATAGTGGCGTTCCCTATTCGA-5'

Ces deux oligonucléotides ont ensuite été hybridés pour reconstituer la séquence double brin OR3 bordée de séquences permettant son clonage
5 orienté comme suit :

GATCCTATCACCGCAAGGGATAA
GATAGTGGCGTTCCCTATTCGA

1.3. Construction de cassettes d'expression de gènes toxiques

Les cassettes d'expression de gènes toxiques sont obtenues à partie
10 des plasmides décrits ci-dessus (1.1. et 1.2.) par remplacement de la
séquence CAT par la séquence codant pour le produit toxique, de préférence
le gène Grb3-3 (PCT/FR94/00542), le gène de la thymidine kinase, le gène
codant pour la toxine diphtérique ou pseudomonas, etc.

Exemple 2 : Construction d'un anticorps simple chaîne spécifique de p53

15 Cet anticorps simple chaîne a été construit selon le protocole suivant :

- Les cDNA codant pour les régions VH et VL ont été obtenus à partir
de l'hybridome pAb421 produisant un anticorps anti-p53. Pour cela, les ARN
totaux de l'hybridome ont été extraits et soumis à une réaction de
transcription inverse en utilisant des hexamères random comme amores.
20 L'utilisation de ce type d'amorce permet d'éviter l'emploi d'amores
spécifiques des immunoglobulines. Les clones d'ADNc obtenus ont une
longueur suffisante pour cloner les régions V. Toutefois, dans la mesure où
ils représentent une faible fraction des cDNA totaux présents, une réaction
préalable d'amplification doit être réalisée pour produire suffisamment de
25 DNA pour le clonage. Pour cela, les ADNc codant pour les régions VH et VL
ont été amplifiés séparément. Les amores utilisées sont des
oligonucléotides hybridant au niveau des extrémités opposées des régions
variables de chaque chaîne (H et L). Le produit d'amplification utilisant les
amores spécifiques des chaînes lourdes est un fragment de 340 paires de

bases environ. Le produit d'amplification utilisant les amores spécifiques des chaines légères est un fragment de 325 paires de bases environ.

- Après purification, les ADNc codant pour les régions VH et VL de l'anticorps ont été assemblés en une chaîne unique au moyen d'un bras nucléotidique (L). Le bras nucléotidique a été construit de telle sorte que l'une des extrémités se lie à l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour la région VH et l'autre à l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour la région VL. La séquence du bras code pour le peptide SEQ ID n° 5. La séquence assemblée de 700 pb environ contient, sous forme d'un fragment Ncol-NotI, l'enchaînement VH-L-VL dont la séquence est représentée SEQ ID n° 4 (acides aminés 9 à 241). Cette séquence inclut également en C-terminal la séquence tag de myc (résidus 256 à 266).

Exemple 3 : Construction de séquences d'acides nucléiques codant pour des molécules chimériques bispécifiques contant un domaine de liaison à un transactivateur constitué d'un anticorps simple chaîne (ScFv).

3.1. Construction d'un plasmide comportant une séquence ScFv-myc-Hinge-TetR ou Cro (Figures 5A et 6)

Le fragment Ncol-NotI contenant l'ADNc codant pour le ScFv anti-p53 a tout d'abord été cloné dans un plasmide de type pUC19. La séquence codant pour l'épitope VSV (SEQ ID n° 7) ou myc (SEQ ID n° 8) est insérée en aval du fragment (Figure 6).

Les séquences codant pour les protéines TetR et Cro ont ensuite été obtenues comme suit :

- La séquence codant pour TetR a été obtenue par amplification à partir d'un plasmide matrice portant la séquence tetR au moyen des oligonucléotides suivants :

Oligo 5474 (SEQ ID n° 10) :

GGCTCTAGACCCAAGCCCAGTACCCCCCCAGGTTCTAACGCG
TGGATCCATGTCCAGATTAGATAAAAGTAAAG

Oligo 5475 (SEQ ID n° 11) :

CGTACGGAATTGGGCCCTTACTCGAGGGACCCACTTCACATTT
AAGTTG

Ces oligonucléotides apportent également la séquence codant pour le bras peptidique Hinge reliant les deux domaines fonctionnels de la molécules.

Le fragment amplifié contient donc la séquence codant pour le bras peptidique et pour le domaine de liaison à l'ADN tetR. Ce fragment a été cloné aux sites XbaI-EcoRI du plasmide obtenu ci-dessus pour générer un plasmide contant la séquence codant pour la molécule ScFv-myc-Hinge-TetR (Figure 6).

- La séquence codant pour Cro a été obtenue par amplification sur une matrice d'ADN du bactériophage Lambda au moyen des oligonucléotides suivants :

15 Oligo 5531 (SEQ ID n° 12) :

GGCTCTAGACCCAAGCCCAGTACCCCCCCCAGGTTCTAACGCG
TGGATCCATGGAACAAACGCATAACCCTGAAAG

Oligo 5532 (SEQ ID n° 13) :

20 ACTCGG

Ces oligonucléotides apportent également la séquence codant pour le bras peptidique Hinge reliant les deux domaines fonctionnels de la molécules.

Le fragment amplifié contient donc la séquence codant pour le bras peptidique et pour le domaine de liaison à l'ADN Cro. Ce fragment a été cloné aux sites XbaI-EcoRI du plasmide obtenu ci-dessus pour générer un plasmide contant la séquence codant pour la molécule ScFv-myc-Hinge-Cro (Figure 6).

3.2. Construction d'un plasmide comportant une séquence ScFv-
30 Hinge-TetR ou Cro (Figure 5B)

Cet exemple décrit la construction de plasmides portant une séquence codant pour une molécule chimérique bispécifique selon l'invention dépourvue de séquence tag.

Ces plasmides ont été obtenus à partir des plasmides décrits en 3.1. 5 ci-avant par digestion par les enzymes NotI et XbaI. Cette digestion permet d'exciser le fragment portant la région codant pour le tag myc.

3.3. Construction d'un plasmide comportant une séquence ScFv-TetR ou Cro (Figure 5C)

Cet exemple décrit la construction de plasmides portant une séquence 10 codant pour une molécule chimérique bispécifique selon l'invention dépourvue de bras et de séquence tag.

Ces plasmides ont été obtenus à partir des plasmides décrits en 3.1. 15 ci-avant par digestion par les enzymes NotI et BamHI. Cette digestion permet d'exciser le fragment portant la région codant pour le tag myc et pour le bras peptidique Hinge.

Exemple 4 : Construction de séquences d'acides nucléiques codant pour des molécules chimériques bispécifiques contant un domaine de liaison à un transactivateur constitué d'un domaine d'oligomérisation.

4.1. Clonage de la région d'oligomérisation de la protéine p53 20 (fragment 320-393).

L'ADNc codant pour la région d'oligomérisation de la protéine p53 (SEQ ID n° 3) a été obtenu par amplification par PCR sur un plasmide portant le cDNA de la p53 sauvage humaine à l'aide des oligonucléotides suivants :

25 Oligo 5535 (SEQ ID n° 14) :

CAGGCCATGGCATGAAGAAACCACTGGATGGAGAA

(la partie soulignée représente un site Ncol)

Oligo 5536 (SEQ ID n° 15) :

CGTCGGATCCTCTAGATGCGGCCGCGTCTGAGTCAGGCCCTTC

(Partie soulignée : site BamHI; Double-souligné : site XbaI; Gras : site NotI).

4.2. Les plasmides p53 320/393-myc-Hinge-TetR ou Cro (Figure 5A) ont été obtenus par clonage du fragment amplifié ci-dessus sous forme d'un 5 fragment Ncol-NotI dans les sites correspondants des plasmides décrits dans l'exemple 3.1., en substitution de la région codant pour le ScFv.

4.3. Les plasmides p53 320/393-Hinge-TetR ou Cro (Figure 5B) ont été obtenus par clonage du fragment amplifié en 4.1. sous forme d'un fragment Ncol-XbaI dans les sites correspondants des plasmides décrits 10 dans l'exemple 3.1., en substitution de la région codant pour le ScFv et le tag.

4.4. Les plasmides p53 320/393-TetR ou Cro (Figure 5C) ont été obtenus par clonage du fragment amplifié en 4.1. sous forme d'un fragment Ncol-BamHI dans les sites correspondants des plasmides décrits dans 15 l'exemple 3.1., en substitution de la région codant pour le ScFv, le tag et le Hinge.

4.5. Les plasmides tetR ou Cro- p53 320/393 (Figure 5D) ou tetR ou Cro-Hinge-p53 320/393 (Figure 5E) ont été obtenus par clonage de fragments amplifiés par PCR sur un plasmide portant le cDNA de la p53 humaine sauvage à l'aide des oligos 5537/5539 ou 5538/5539 digérés par 20 Xhol/EcoRI dans les plasmides décrits en 3.1., préalablement digérés par Xhol/EcoRI.

Oligo 5537 (SEQ ID n° 16) :

CAGGCTCGAGAAGAAACCACTGGATGGAGAA

25 Oligo 5538 (SEQ ID n° 17) :

CAGGCTCGAGCCCCAGTACCCCCCCCAGGTTCTCAAAGA

AACCACTGGATGGAGAA

Oligo 5539 (SEQ ID n° 18) :

GGTCGAATTGGGCCCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTC

Exemple 5 : Construction d'un plasmide contrôle portant un séquence codant pour une molécule chimérique comportant un domaine de liaison à l'ADN (TetR ou Cro) et le domaine transactivateur de la protéine p53 (région 1-73).

Les plasmides p53 1/73 - TetR ou Cro avec ou sans tag (myc ou VSV) et
5 Hinge (Figures 7 A, B et C) ont été obtenus par clonage de fragments amplifiés par PCR à partir d'un plasmide portant le cDNA de la p53 sauvage humaine à l'aide des oligos 5661/5662 puis digérés par NcoI/NotI, NcoI/XbaI, NcoI/BamHI dans les plasmides décrits en 3.1., préalablement digérés par NcoI/NotI, NcoI/XbaI ou NcoI/BamHI.

10 Oligo 5661 (SEQ ID n° 19) :

CAGGCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATCC

Oligo 5662 (SEQ ID n° 20) :

CGTCGGATCCTCTAGATGCGGCCACGGGGGGAGCAGCCTC

TGG

15 Exemple 6 : Construction de plasmides d'expression de différentes molécules hybrides de l'invention

Les plasmides utilisés pour l'expression de molécules hybrides ont été obtenus par clonages des fragments contenant les cDNA codant pour ces molécules aux sites NcoI/EcoRI du vecteur d'expression eukaryote pcDNA3
20 (Invitrogen). Les différentes constructions ainsi effectuées sont les suivantes:

- ScFv 421: SEQ IDn°4
- TET19: protéine hybride contenant l'enchaînement ScFv421-VSV-Hinge-TetR décrite en figure 6 suivant l'exemple 3.1
- TET02: protéine hybride contenant l'enchaînement p53(320/393)-VSV-Hinge-TetR décrite en figure 5A suivant l'exemple 4.3
- TET03: protéine hybride contenant l'enchaînement p53(320/393)-Hinge-TetR décrite en figure 5B suivant l'exemple 4.4

- TET04: protéine hybride contenant l'enchaînement p53(320/393)-TetR décrite en figure 5C suivant l'exemple 4.4
 - TET07: protéine hybride contenant l'enchaînement p53(1/73)-VSV-Hinge-TetR décrite en figure 7A suivant l'exemple 5
- 5 **Exemple 7 : Reconnaissance de séquences d'ADN double brin spécifiques par les molécules hybrides de l'invention**

7.1. Production des molécules hybrides

Les différentes molécules utilisées dans cette expérience ont été obtenues par traduction *in vitro* en lysat de réticulocytes des molécules décrites dans
10 l'exemple 6 en utilisant le kit TNT Coupled Reticulocyte lysate Systems (Promega) suivant le protocole expérimental décrit par le fournisseur pour un volume réactionnel total de 50 µl.

7.2 Construction de la séquence d'ADN double brin spécifique

La séquence d'ADN double brin spécifique utilisée dans cette expérience est
15 constituée de deux oligonucléotides de synthèse dont la séquence est la suivante:

Oligo 5997 (SEQ ID n°24):

GATCCGACTTCACTTTCTCTATCACTGATAGTGAGTGGTAAACTCA

Oligo 5998 (SEQ ID n°25):

20 AGCTTGAGTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAGTCG

Ces deux oligonucléotides de synthèse ont été marqués au phosphore 33 par incubation de 30min à 37°C de 10 pmole de chaque oligonucléotide dans 10 µl du milieu réactionnel suivant:

	Tris-HCl pH7,6	50mM
25	MgCl ₂	10mM
	dithiothréitol	5mM

Spermidine	100µM
EDTA	100µM
ATP-γ- ³² P (Amersham)	50µCi (1000-3000 Ci/mmol)
T4 kinase (Boehringer)	10U

- 5 Puis les deux oligonucléotides ainsi marqués ont été hybridés en présence de 400mM NaCl pour reconstituer la séquence double brin TetO suivante (SEQ ID n°26):

GATCCGACTTCACTTTCTCTATCACTGATAGTGAGTGGTAAACTCA
CTAGGCTCAAAGTGAAAAGAGATAGTGAATCACTCACCATTGAGT

- 10 7.3 Reconnaissance de la séquence double brin TetO par les différentes molécules hybrides de l'invention

La réaction de liaison à l'ADN est effectuée dans 50 µl de milieu réactionnel (Tris-HCl pH7,4 10mM, MgCl₂ 10mM, KCl 10mM, β-mercaptopropanoïde 6mM, EDTA 0,1mM, BSA 0,5mg/ml) par addition de la séquence TetO (10⁻¹⁰M) préparée selon l'exemple 7.2, de 10 µl du produit de traduction préparé selon l'exemple 7.1 et de 10⁻⁶M de l'oligonucléotide compétiteur froid AP2 (Promega) utilisé pour éliminer la fixation non spécifique. La spécificité de l'interaction est vérifiée par déplacement de l'équilibre par addition de tétracycline 10 µM (Sigma) dans le milieu réactionnel. Les mélanges réactionnels sont incubés 15min à 20°C puis additionné de 10 µl de glycérol à 50 %, et les mélange finaux sont soumis à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide à 5 % avec migration à 200V et 16°C. Le gel est ensuite séché et autoradiographié.

Le résultat de cette expérience effectuée avec les molécules hybrides TET19, TET02 et TET07 est présenté sur la figure 9. Dans ces conditions, la liaison de ces trois molécules à la séquence d'ADN spécifique double brin TetO est observée par un retard de migration de celle-ci, et la spécificité de

cette interaction est mise en évidence par l'inhibition de ce retard par addition de tétracycline.

Ce résultat confirme donc que les molécules hybrides de l'invention sont capables de se lier de façon spécifique à la séquence nucléotidique TetO

5 Exemple 8 : Liaison spécifique des molécules hybrides de l'invention à une molécule présentant un domaine transactivateur transcriptionnel.

8.1.. Production des molécules hybrides de l'invention et de molécules présentant ou non un domaine transactivateur transcriptionnel.

Pour cette expérience, les molécules hybrides de l'invention ScFv 421,
10 TET19 et TET02 selon l'exemple 6 ont été produites par traduction in vitro en utilisant le protocole expérimental selon l'exemple 7.1 en présence de 44 μ Ci de 35 S-methionine (Amersham) (1175 Ci/mmol) pour générer ces molécules hybrides radioactivement marquées.

Les cDNA des molécules présentant ou non un domaine transactivateur transcriptionnel ont été clonés dans le vecteur pBlueBacIII (Invitrogen) au site BamHI. A partir de ces vecteurs, des baculovirus recombinants ont été produits et purifiés suivant les instructions du fabricant. Les molécules sont produites par infection avec le baculovirus recombinant de cellules d'insecte sf9 suivant le protocole expérimental du fabricant. Des extraits protéiques à la concentration protéique finale de 10mg/ml sont préparés suivant le protocole décrit par K. Ory et al. (K. Ory, EMBO J., 13, 20 3496-3504, 1994). Ces molécules sont les suivantes:

- p53 (1/393): protéine p53 sauvage
- p53 (1/320): protéine p53 sauvage limitée à sa séquence en acide aminé 1
25 à 320 et donc dépourvue de son domaine d'oligomérisation et du domaine reconnu par l'anticorps monoclonal pAb421.

8.2. Liaison des molécules hybrides de l'invention aux molécules présentant ou non un domaine transactivateur transcriptionnel

5 5 µl de chacun des produits de traduction in vitro préparés selon l'exemple 8.1 ont été incubés avec 5µl de l'extrait baculovirus préparé selon l'exemple
10 5. 8.1 et 2µg de l'anticorps monoclonal DO1 (Oncogene Sciences) qui reconnaît l'extrémité N-terminale de la protéine p53 pendant 16 heures à 4°C dans 100µl de tampon RIPA modifié ((K. Ory, EMBO J., 13, 3496-3504, 1994). L'immunoprecipitation est réalisé comme décrit par K. Ory et al. (K. Ory, EMBO J., 13, 3496-3504, 1994). Les complexes retenus par l'anticorps sont
15 élusés par incubation de 10min à 80°C en présence de 30µl de tampon de migration (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970) et soumis à électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en milieu dénaturant à 200V suivant le protocole précédemment décrit (Laemmli U.K., Nature, 227, 680-685, 1970). Le gel est ensuite séché et révélé à l'aide d'un instantimager (Packard instruments) qui permet de quantifier les quantités de molécules hybrides liées à la molécule présentant ou non un domaine transactivateur transcriptionnel. Les résultats de cette expérience sont représentés sur la figure 10.

20 Dans ces conditions, il apparaît nettement que la molécule hybride présentant le ScFv 421 (TET19) reconnaît bien la molécule p53 (1/393) de façon équivalente au ScFv 421 seul, et la molécule hybride présentant le domaine 320/393 (TET02) présente les mêmes propriétés mais avec un pouvoir de rétention de la p53(1/393) beaucoup plus important. De plus, l'absence de signal observé lors de l'incubation avec la molécule p53(1/320)
25 montre que ces interactions sont bien spécifiques et médiées par l'extrémité C-terminale de la protéine p53 (acides aminés 320 à 393) comme attendu.

Ces résultats confirment donc que les molécules hybrides de l'invention sont bien capables de recruter un domaine transactivateur transcriptionnel porté par une molécule dont elles sont des partenaires spécifiques.

Exemple 9 : Recrutement fonctionnel d'un domaine transactivateur transcriptionnel par les molécules hybrides de l'invention

Le recrutement fonctionnel d'un domaine transactivateur transcriptionnel par les molécules hybrides de l'invention a été évalué dans un système de transactivation *in vivo* dans les cellules SAOS-2 (ostéosarcome humain) déficientes pour les deux allèles de la protéine p53, dans la lignée tumorale H358 déficiente pour les deux allèles de la protéine p53 (Maxwell & Roth, Oncogene 8, 3421, 1993) et dans la lignée tumorale HT29 déficiente pour un des deux allèles de la protéine p53 et présentant un allèle muté (mutation H273). Ce système repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur dosable enzymatiquement et placé sous la dépendance d'un promoteur contenant les motifs nucléotidiques de reconnaissance spécifique par le répresseur Tet. (Opérateur Tet).

Dans ce test, le gène rapporteur LUC (luciférase) placé sous contrôle de l'opérateur Tet est contenu dans le plasmide pUHC13-3 (Gossen M. & Bujard H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547-5551, 1992).

9.1 Lignées cellulaires utilisées et conditions de culture

Les lignées cellulaires utilisées dans ces expériences ainsi que leur génotype lié à la protéine p53 et les milieu de culture utilisés pour leur croissance sont reportés dans le Tableau ci-dessous :

Tableau: lignées cellulaires

Lignée	p53	Milieu de culture	n°ATCC
SAOS-2	-/-	milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL)	HTB 85
H358	-/-	milieu RPMI1640 (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL)	
HT29	-/H273	milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal (Gibco BRL)	

9.2. Plasmides d'expression des molécules présentant un domaine transactivateur transcriptionnel

Les molécules présentant un domaine transactivateur transcriptionnel utilisées dans cette expérience sont la protéine p53 sauvage (wt) et les mutant G281 et H175 de cette protéine. Les cDNA codant pour ces trois protéines ont été insérés au site BamHI du vecteur pcDNA3 (Invitrogen).

9.3. Expression intracellulaire des molécules hybrides de l'invention

Les molécules hybrides de l'invention sont exprimées dans les cellules en culture par transfection transitoire en utilisant le protocole suivant :

Les cellules ($3,5 \cdot 10^5$) sont ensemencées dans des plaques 6 trous contenant 2 ml de milieu de culture, et cultivées sur la nuit dans un incubateur à CO₂ (5 %) à 37°C. Les différentes constructions sont alors transfectées en utilisant la lipofectAMINE (Gibco BRL) comme agent de transfection de la façon suivante: 1,5 µg de plasmide total sont incubés (dont 0,25 µg du plasmide reporter) avec 5 µl de lipofectAMINE pendant 30 min avec 2 ml de milieu de culture sans sérum (mélange de transfection). Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis incubées 4 h à 37°C avec le mélange de transfection, après quoi celui-ci est aspiré et remplacé par 2 ml de milieu culture additionné de 10 % de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et les cellules remises à pousser pendant 48 h à 37°C.

9.4. Détection de l'activation de la transcription

L'activation de la transcription liée au recrutement fonctionnel du transactivateur transcriptionnel est détectée et quantifiée par la mesure de l'activité luciférase codée par le gène LUC en utilisant le kit Luciferase Assay System (Promega) selon le protocole expérimentale du fabricant.

9.5. Recrutement fonctionnel d'un domaine transactivateur transcriptionnel par les molécules de l'invention

Cette expérience a été effectuée en utilisant les molécules TET02, TET03 et TET07 selon l'exemple 6. Dans cette expérience la molécule TET07 sert de 5 contrôle positif puisqu'elle possède son propre domaine transactivateur transcriptionnel.

Les résultats obtenus dans les cellules SAOS-2 et présentés dans la figure 11 montrent que la molécule TET07 est bien capable à elle seule d'activer la transcription du gène LUC placé sous le contrôle de l'opérateur Tet 10 contrairement à la construction TET02. Ceci est en accord avec le fait que cette lignée cellulaire ne contient pas de protéine p53 endogène qui ne peut donc être recrutée par la molécule TET02. Par contre, l'introduction de la protéine p53 sauvage ou de son mutant G281 qui ne produisent pas de signal à elles seules, est capable de générer une activité transcriptionnelle en 15 présence de la molécule TET02. Un tel résultat n'est pas observable avec le mutant H175 décrit dans la littérature comme présentant un domaine transactivateur transcriptionnel non fonctionnel.

Ce résultat obtenu dans la lignée cellulaire SAOS-2 avec la molécule TET02 a pu être reproduit dans une lignée tumorale ne contenant pas non plus de 20 p53 endogène (cellules H358) et a pu être étendu aux molécules TET03 et TET04 (figure 12).

Dans le but de confirmer ces deux résultats dans un contexte cellulaire différent, la molécule TET02 ainsi que le contrôle positif TET07 ont été exprimées dans les cellules HT29 qui présentent une protéine p53 endogène 25 mutante (H273), le contrôle négatif de cette expérience consistant à transfacter le vecteur pcDNA3 vide. Le résultat de cette expérience, présenté dans le Tableau ci-dessous, montre que la molécule TET02 est bien capable

de recruter le domaine transactivateur transcriptionnel de la protéine p53 endogène.

Tableau : Activation transcriptionnelle des molécules hybrides de l'invention dans les cellules HT29

5

pcDNA3	TET07	TET02
1	59	10

L'ensemble de ces expériences montre donc que les molécules hybrides de l'invention sont bien capables de lier à la fois des séquences d'ADN double brin spécifiques et des protéines présentant un domaine transactivateur transcriptionnel, et que ces molécules sont capables d'induire de manière conditionnelle l'expression de gènes d'intérêt.
10

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUE: 20, AVENUE RAYMOND ARON
- (C) VILLE: ANTONY
- (D) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92165
- (G) TELEPHONE: (1) 40.91.70.36
- (H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.91

10

15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: SYSTEME D'EXPRESSION CONDITIONNEL

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 26

20

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TCTCTATCAC TGATAGGGA

19

45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

50

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TATCACCGCA AGGGATA

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 74 acides amin,s
- (B) TYPE: acide amin,
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

10

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

15

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Lys Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg
1 5 10 15

25

Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys
20 25 30

30

Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser
35 40 45His Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu
50 55 60

35

Met Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
65 70

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 768 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

50

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTACTCGCGG CCCAGCCGGC CATGGCCCAG GTGCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAGCTT

60

	GTAAGGTCAG GGGCCTCACT CAAGTTGTCC TGCACAGCTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC	120
5	TACTATATGC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGATGGATT	180
	GATCCTAAGA ATGGTGATAC TGAATATGCC CCGAAGTTCC AGGGCAAGGC CACTATGACT	240
	GCAGACACAT CCTCCAATAC AGCCTACCTG CAGCTCAGCA GCCTGGCATC TGAGGACACT	300
10	GCCGTGTATT ATTGTAATT TTACGGGAT GCTTTGGACT ATTGGGGCCA AGGGACCACG	360
	GTCACCGTCT CCTCAGGTGG AGGCAGGTCA GGCGGAGGTG GCTCTGGCGG TGGCGGATCG	420
15	GATGTTTGA TGACCCAAAC TCCACTCACT TTGTCGGTTA CCATTGGACA ACCAGCCTCC	480
	ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTG GATA GTGATG GAAAAACATA TTTGAATTGG	540
	TTGTTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CGCCTAAATCT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC	600
20	TCTGGAGTCC CTGACAGGTT CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTCAC ACTTAAAATC	660
	AACAGAGTGG AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTATTGCT GGCAAGGTAC ACATTCTCCG	720
	CTTACGTTCG GTGCTGGCAC CAAGCTGGAA ATTAAACGGG CGGCCGCA	768
25		

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 15 acides amin,s
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

40 (iv) ANTI-SENS: NON

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5				10				15

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

5 (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT:1..30

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA
Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
1 5 10

30

15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

25

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

30

(iv) ANTI-SENS: NON

35 (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT:1..18

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

40 ATG AAC CGG CTG GGC AAG
Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5

18

45 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

50

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

55

(iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
(B) EMPLACEMENT: 1..33

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

33

10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

15

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 7 acides aminés
(B) TYPE: acide aminé
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

25

(iv) ANTI-SENS: NON

30

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

40

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 66 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

55

GGCTCTAGAC CCAAGCCCAG TACCCCCCAA GGTTCTTCAA CGCGTGGATC CATGTCCAGA
TTAGATAAAA GTAAAG

60

66

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

10 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CGTACGGAAT TCGGGCCCTT ACTCGAGGGA CCCACTTTCA CATTAAAGTT G

51

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

30 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

35 (iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCCTCTTACGCGAACCCGAGTTCGGGGGGCGTTCTTGTGCGCTCGATGCGTCAAG

60

GGGATTAACCGG TCAAAAG

45 (3) INFORMATIONS POUR LA SEC ID NO: 11

(iii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

5 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CGTACGGAAT TCGGGCCCTT ACTCGAGTGC TGTTGTTTT TTGTTACTCG G

10 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- 15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 35 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

25 (iv) ANTI-SENS: NON

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CAGGCCATGG CATGAAGAAA CCACTGGATG GAGAA

35

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 43 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

45 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

50 CGTCGGATCC TCTAGATGCG GCCGCGTCTG AGTCAGGCC TTC

43

55 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- 55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- 15 (iv) ANTI-SENS: NON

20 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

CAGGCCATGG AGGAGCCGCA GTCAGATCC

29

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

GGTCAATTG GGGCCCTCAG TCTGAGTCAG GCCCTTC

37

30 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC
- 40 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON

45

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CGTCGGATCC TCTAGATGCG GCCGCCACGG GGGGAGGCAGC CTCTGG

46

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:

- 55 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 66 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

5 (iv) ANTI-SENS: NON

10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
1 5 10 15

15 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
20 25 30

20 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
35 40 45

25 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
50 55 60

25 Thr Ala
65

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

40 (iv) ANTI-SENS: NON

45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

GATCCTATCA CCGCAAGGGA TAA

23

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

10 GATAGTGGCG TTCCCTATTT CGA

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:

15 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 48 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

25 (iv) ANTI-SENS: NON

30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

GATCCGACTT TCACCTTTCT CTATCACTGA TAGTGAGTGG TAAACTCA

48

35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 48 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
40 (C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

45 (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

55 AGCTTGAGTT TACCACTCCC TATCAGTGAT AGAGAAAAGT GAAAGTCG

48

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 96 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

10

(iv) ANTI-SENS: NON

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

GATCCGACTT TCACTTTCT CTATCACTGA TAGTGAGTGG TAAACTCACT AGGCTCAAAG	60
TGAAAAGAGA TAGTGACTAT CACTCACCAT TTGAGT	96

20

REVENDICATIONS

1. Molécule chimérique bispécifique comprenant un domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN et un domaine détecteur capable de lier spécifiquement un transactivateur ou transrépresseur ou un complexe transactivateur ou transrépresseur caractéristique d'un état physiologique ou physiopathologique.
5
2. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive d'une protéine capable d'interagir avec l'ADN.
- 10 3. Molécule selon la revendication 2 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive d'une protéine eucaryote.
4. Molécule selon la revendication 3 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive des protéines p53, STAT ou NFkB.
15
5. Molécule selon la revendication 2 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive d'une protéine procaryote.
6. Molécule selon la revendication 5 caractérisée en ce que la protéine procaryote est un répresseur bactérien.
20
7. Molécule selon la revendication 6 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive la protéine tetR.
8. Molécule selon la revendication 6 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN dérive la protéine Cro.
25

9. Molécule selon l'une des revendications 2 à 8 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN comprend le domaine d'interaction avec l'ADN de ladite protéine.
10. Molécule selon l'une des revendications 2 à 8 caractérisée en ce que le 5 domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN est constitué de la protéine complète.
11. Molécule selon la revendication 10 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN est constitué de la protéine tetR.
- 10 12. Molécule selon la revendication 10 caractérisée en ce que le domaine capable de lier sélectivement une séquence définie d'ADN est constitué de la protéine Cro.
13. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur ou transrépresseur ou le 15 complexe transactivateur ou transrépresseur est un domaine d'oligomérisation.
14. Molécule selon la revendication 13 caractérisée en ce que le domaine d'oligomérisation est un leucine-zipper, un domaine SH3 ou SH2.
15. Molécule selon la revendication 13 caractérisée en ce que le domaine 20 d'oligomérisation capable de lier spécifiquement le transactivateur est constitué de la partie C-terminale de la protéine p53.
16. Molécule selon la revendication 15 caractérisée en ce que le domaine d'oligomérisation est constitué de la partie C-terminale de la protéine p53 allant du résidu 320 à 393 (SEQ ID n° 3), 302-360 ou 302-390.
- 25 17. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur ou transrépresseur ou le

complexe transactivateur ou transrépresseur est un domaine synthétique ou naturel connu pour interagir avec ledit transactivateur ou transrépresseur ou complexe transactivateur ou transrépresseur.

18. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur ou transrépresseur ou le complexe transactivateur ou transrépresseur est un anticorps ou un fragment ou dérivé d'anticorps dirigé contre le transactivateur ou transrépresseur ou complexe transactivateur ou transrépresseur.
5
19. Molécule selon la revendication 18 caractérisée en ce que le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur ou le complexe transactivateur est constitué par un fragment Fab ou F(ab)'2 d'anticorps ou une région VH ou VL d'un anticorps.
10
20. Molécule selon la revendication 18 caractérisée en ce que le domaine capable de lier spécifiquement le transactivateur ou le complexe transactivateur est constitué par un anticorps simple chaîne (ScFv) comprenant une région VH liée à une région VL par un bras.
15
21. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au transactivateur sont reliés entre eux par l'intermédiaire d'un bras.
20
22. Molécule selon la revendication 21 caractérisée en ce que le bras est constitué d'un peptide comprenant de 5 à 30 acides aminés et, de préférence, de 5 à 20 acides aminés.
23. Molécule selon la revendication 22 caractérisée en ce que le bras est choisi parmi les peptides de séquence SEQ ID n° 5 ou SEQ ID n° 6.

24. Molécule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le domaine de liaison à l'ADN est situé en position N-terminale et le domaine de liaison au transactivateur est situé en position C-terminale.
25. Molécule selon l'une des revendications 1 à 23 caractérisée en ce que le 5 domaine de liaison à l'ADN est situé en position C-terminale et le domaine de liaison au transactivateur est situé en position N-terminale.
26. Molécule chimérique bispécifique de structure ScFv-VSV/myc-Hinge-TET ou Cro (Figure 5A).
27. Molécule chimérique bispécifique de structure ScFv-Hinge-TET ou Cro 10 (Figure 5B).
28. Molécule chimérique bispécifique de structure ScFv-TET ou Cro (Figure 5C).
29. Molécule chimérique bispécifique de structure TET ou Cro-ScFv (Figure 5D).
- 15 30. Molécule chimérique bispécifique de structure TET ou Cro-Hinge-ScFv (Figure 5E).
31. Molécule chimérique bispécifique de structure Oligom-VSV/myc-Hinge-TET ou Cro (Figure 5A), Oligom-Hinge-TET ou Cro (Figure 5B) ou Oligom-TET ou Cro (Figure 5C).
- 20 32. Séquence d'acide nucléique codant pour une molécule chimérique selon l'une des revendications 1 à 31.
33. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 32 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADN.
34. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 32 ou 33 caractérisée 25 en ce qu'elle fait partie d'un vecteur.

35. Système conditionnel d'expression de gènes comprenant :

- une molécule chimérique telle que définie dans les revendications 1 à 31, et,
- une cassette d'expression comportant une séquence régulatrice, un 5 promoteur transcriptionnel minimal et ledit gène.

36. Système conditionnel selon la revendication 35 caractérisé en ce que le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de TetR et la séquence régulatrice comprend la séquence SEQ ID n° 1 ou un dérivé de celle-ci, éventuellement répétée plusieurs fois.

10 37. Système conditionnel selon la revendication 35 caractérisé en ce que le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de Cro et la séquence régulatrice comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou un dérivé de celle-ci, éventuellement répétée plusieurs fois.

15 38. Système conditionnel selon l'une des revendications 35 à 37 caractérisé en ce que le promoteur minimal comprend une boite TATA ou INR.

39. Système conditionnel selon la revendication 38 caractérisé en ce que le promoteur minimal dérive du promoteur du gène de la thymidine kinase.

20 40. Système conditionnel selon la revendication 39 caractérisé en ce que le promoteur minimal est composé des nucléotides -37 à +19 du promoteur du gène de la thymidine kinase.

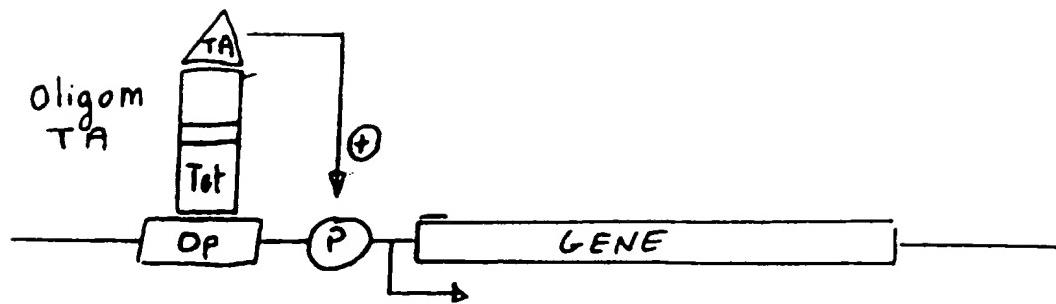
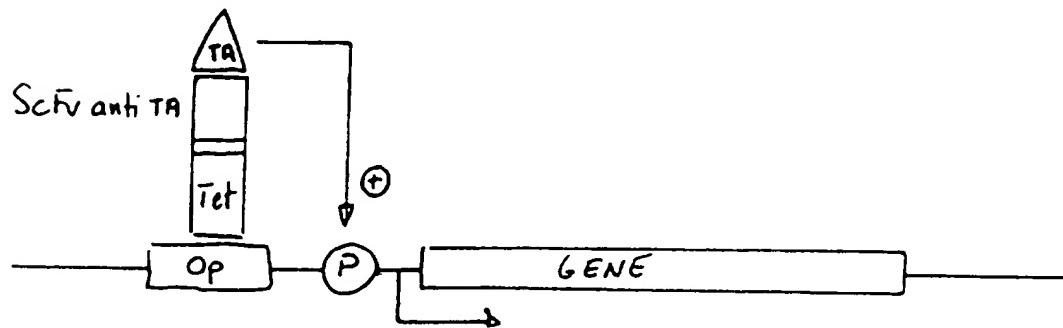
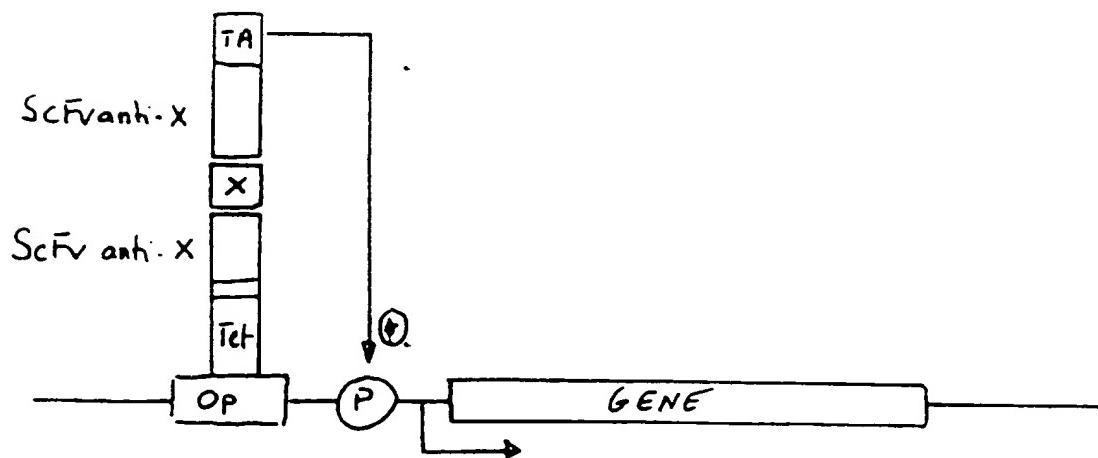
41. Vecteur comprenant :

- une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule chimérique selon l'une des revendications 1 à 31, et
- une cassette d'expression comportant une séquence de régulatrice, 25 un promoteur transcriptionnel minimal et une séquence codante d'intérêt.

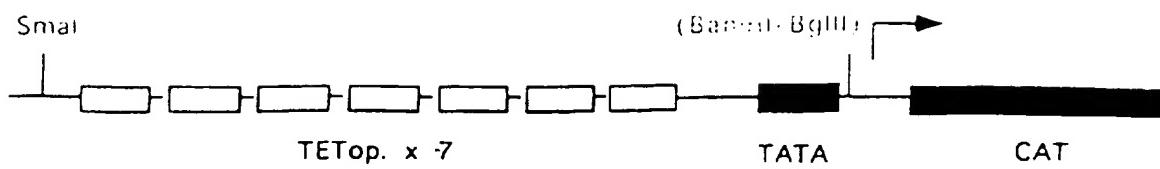
42. Vecteur selon la revendication 41 caractérisé en ce que le promoteur transcriptionnel minimal est défini selon les revendications 38 à 40.
43. Vecteur selon la revendication 41 caractérisé en ce que le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de
5 TetR et la séquence régulatrice comprend la séquence SEQ ID n° 1 ou un dérivé de celle-ci, éventuellement répétée plusieurs fois.
44. Vecteur selon la revendication 41 caractérisé en ce que le domaine de liaison à l'ADN de la molécule chimérique est représenté par tout ou partie de Cro et la séquence régulatrice comprend la séquence SEQ ID n° 2 ou un
10 dérivé de celle-ci, éventuellement répétée plusieurs fois.
45. Vecteur selon l'une des revendications 41 à 44 caractérisé en ce que la séquence codante d'intérêt est une séquence d'ADN codant pour un produit thérapeutique.
46. Vecteur selon la revendication 45 caractérisé en ce que le produit
15 thérapeutique est un peptide ou polypeptide毒ique.
47. Vecteur selon la revendication 46 caractérisé en ce que le produit thérapeutique毒ique est choisi parmi la toxine diphtérique, la toxine pseudomonas, la ricine A, la thymidine kinase, la cytosine désaminase, la protéine Grb3-3, ou le ScFv Y28.
- 20 48. Vecteur selon l'une des revendications 41 à 47 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique.
49. Vecteur selon l'une des revendications 41 à 47 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.
50. Vecteur selon la revendication 49 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
25 adénovirus recombinant défectif.

51. Vecteur selon la revendication 49 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un rétrovirus recombinant défectif.
52. Composition pharmaceutique comprenant au moins un vecteur selon l'une des revendications 41 à 51.
- 5 53. Acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n° 4.
54. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le transactivateur caractéristique d'un état physiologique ou physiopathologique est une protéine d'origine virale, parasitaire, mycobactérienne ou cellulaire possédant une activité transactivateur transcriptionnel.
- 10 55. Molécule selon la revendication 54 caractérisée en ce que le transactivateur est une protéine virale choisie parmi la protéine Tat du virus VIH, les protéines E6/E7 du virus du papillome et la protéine EBNA du virus d'Epstein Barr.
- 15 56. Molécule selon la revendication 54 caractérisée en ce que le transactivateur est une protéine cellulaire, de préférence la protéine p53 mutée ou sauvage.
- 20 57. Molécule selon la revendication 1 caractérisée en ce que le transactivateur ou complexe transactivateur caractéristique d'un état physiologique ou physiopathologique est une protéine apparaissant dans une cellule infectée ou hyperproliférative

1/10

**Figure 1A****Figure 1B****Figure 2**

2/10



TETTop. = GACTTTCACTTTCTCTATCACTGATAGGGAGTGGTAAACTC

Figure 3

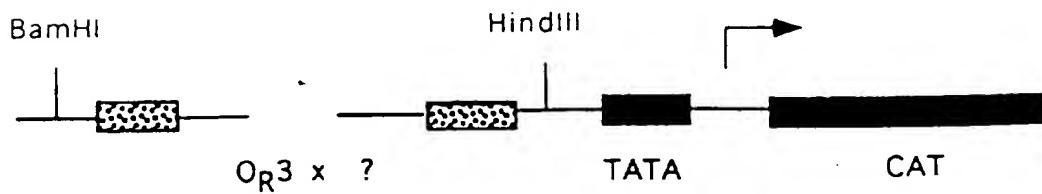


Figure 4

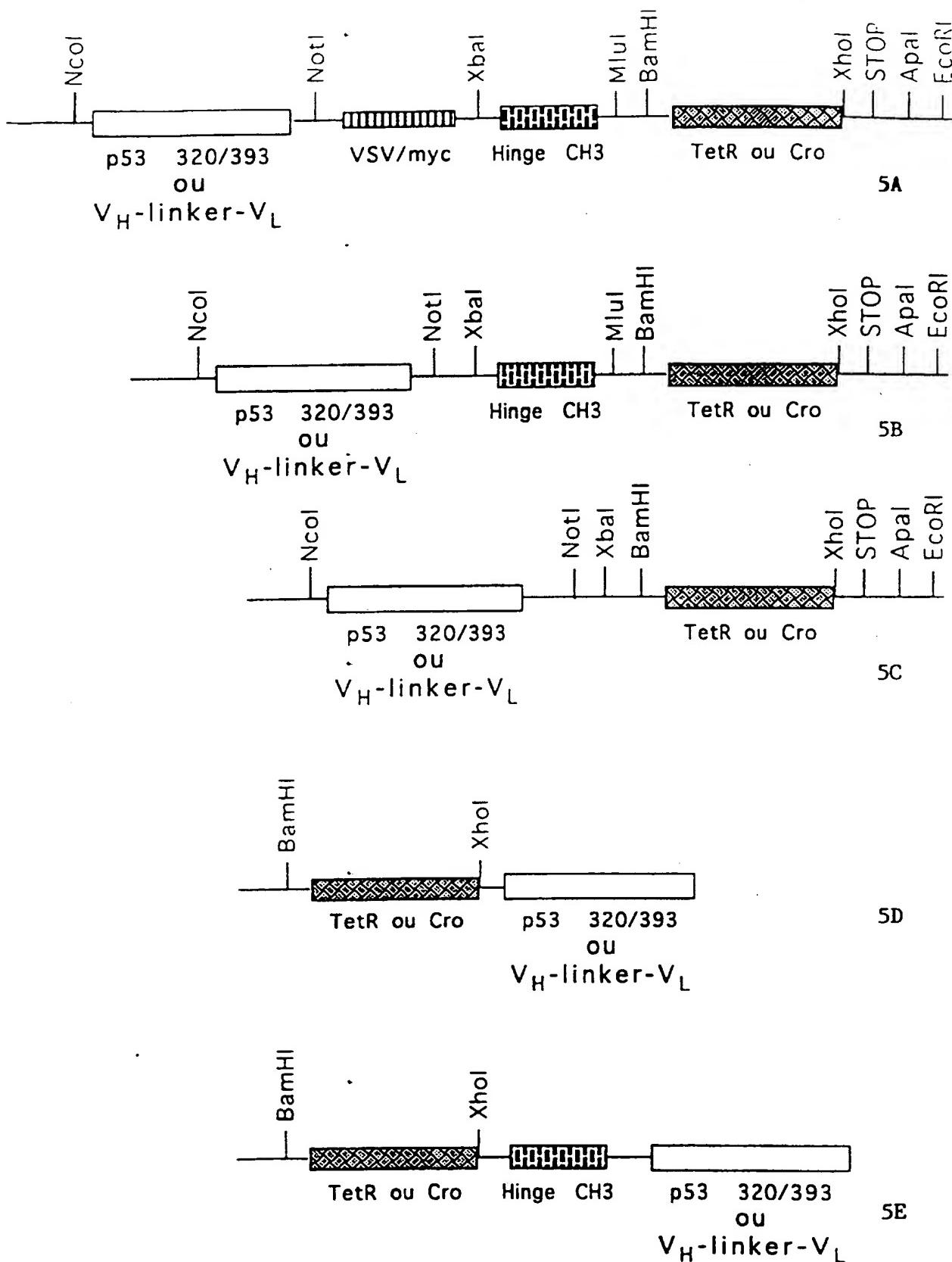
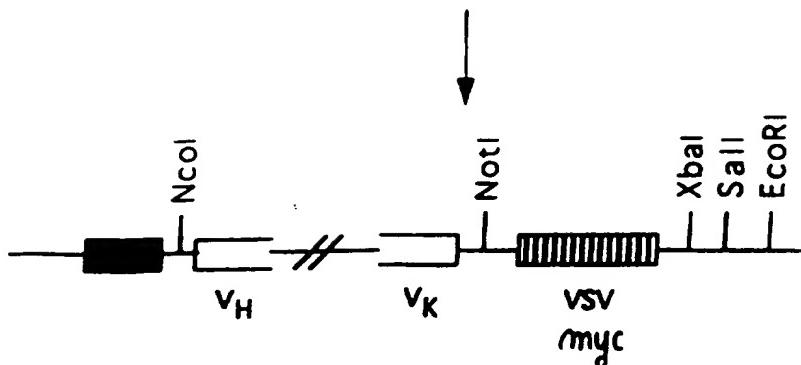


Figure 5

4/10

ScFv + VSV/myc



XbaI Hinge CH3 MluI BamHI

Hinge CH3

Miu

BamHI

(5474) GGC TCT AGA CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA ACG CGT GGA TCC ATG TCC AGA TTA GAT AAA AGT AAA G
ATG TCT AGA TTA GAT AAA AGT AAA G
TET Rep.

TET Rep.

xvi

Apal EcoRI

EcoRI

... CAA CTT AAA TGT GAA AGT GGG TCC CTC GAG TAA GGG CCC GAA TTC CGT ACG

(5475) CGT ACG GAA TTC GGG CCC TTA CTC GAG GGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG TTG

Xbal

Hinge CH₃

Mlu BamHI

(5531) GGC TCT AGA CCC AAG CCC AGT ACC CCC CCA GGT TCT TCA ACG CGT GGA TCC ATG GAA CAA CGC ATA ACC CTG AAA G
ATG GAA CAA CGC ATA ACC CTG AAA G
CRO

CRO

xhol

Apal

EcoRI

... CCG AGT AAC AAA AAA ACA ACA GCA CTC GAG TAA GGG CCC GAA TTC CGT ACG

(5532) CGT ACG GAA TTC GGG CCC TTA CTC GAG TGC TGT TGT TTT TTT GTT ACT CGG

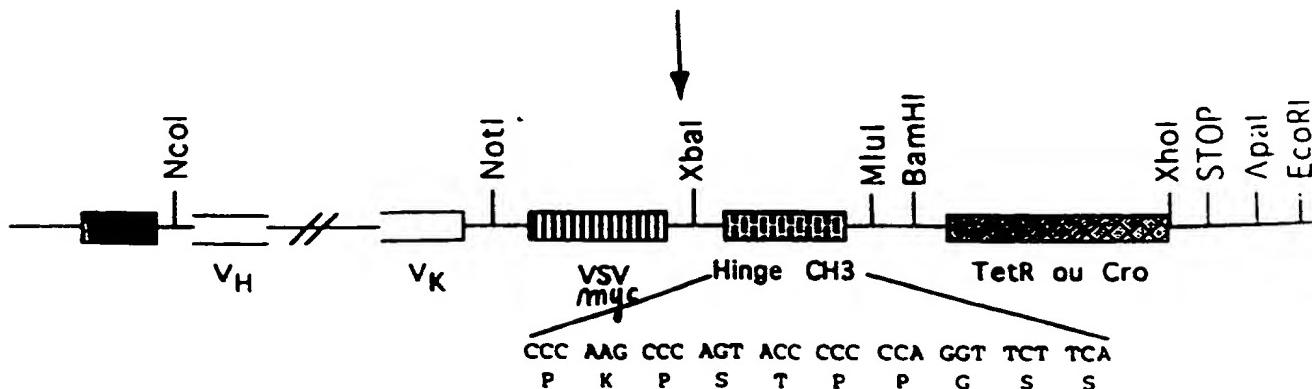


Figure 6
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/10

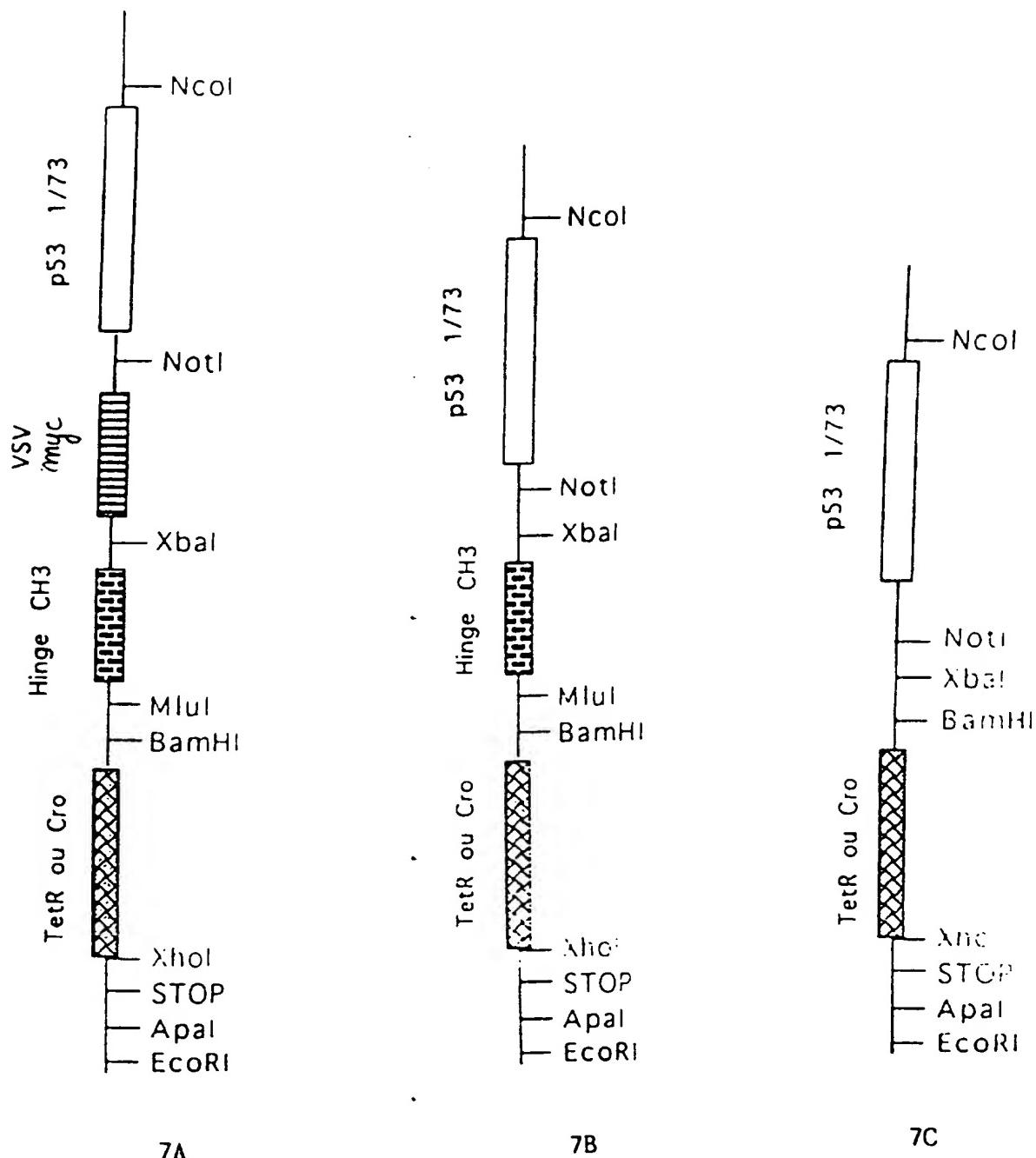


Figure 7

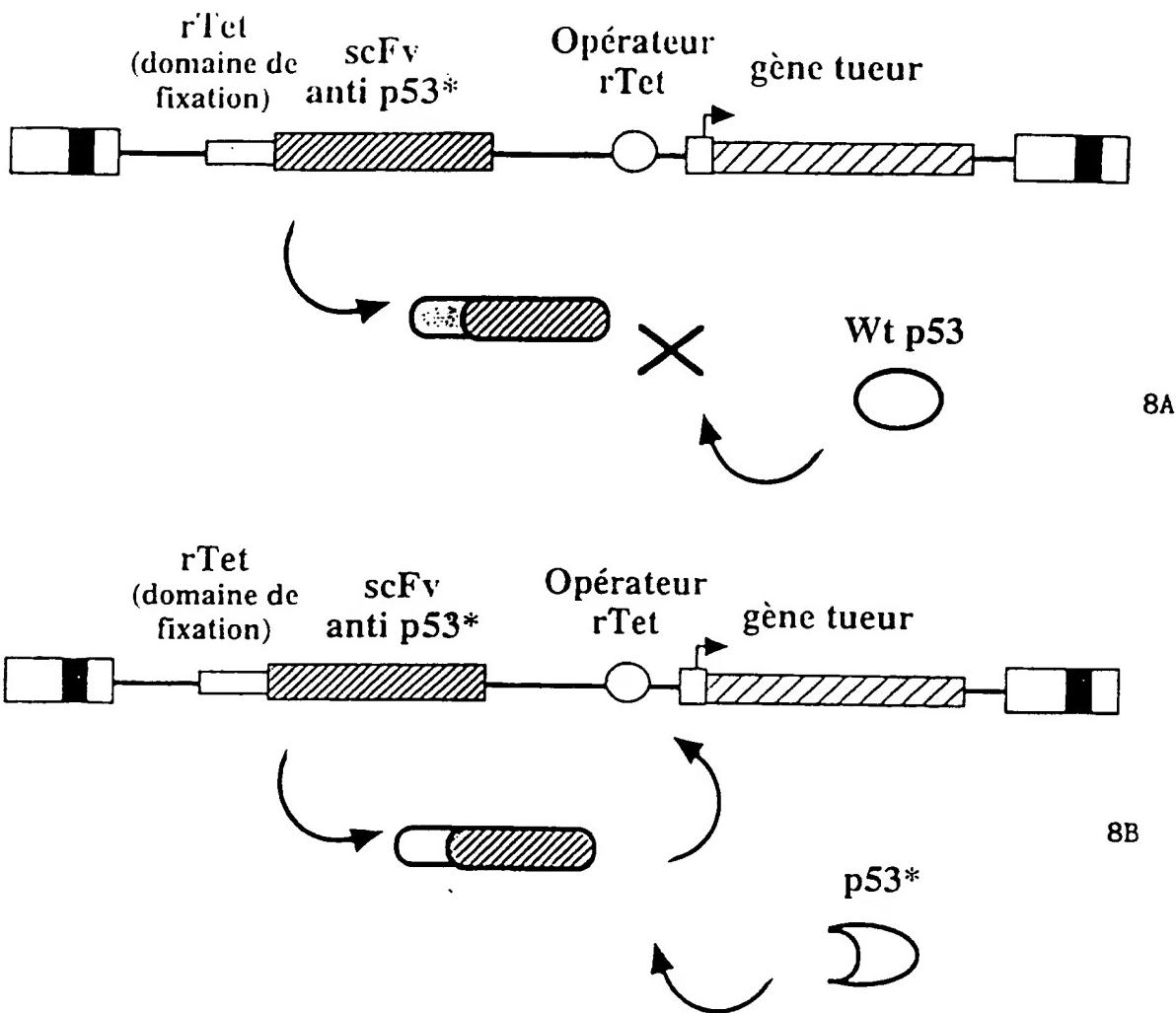


Figure 8

7 / 10

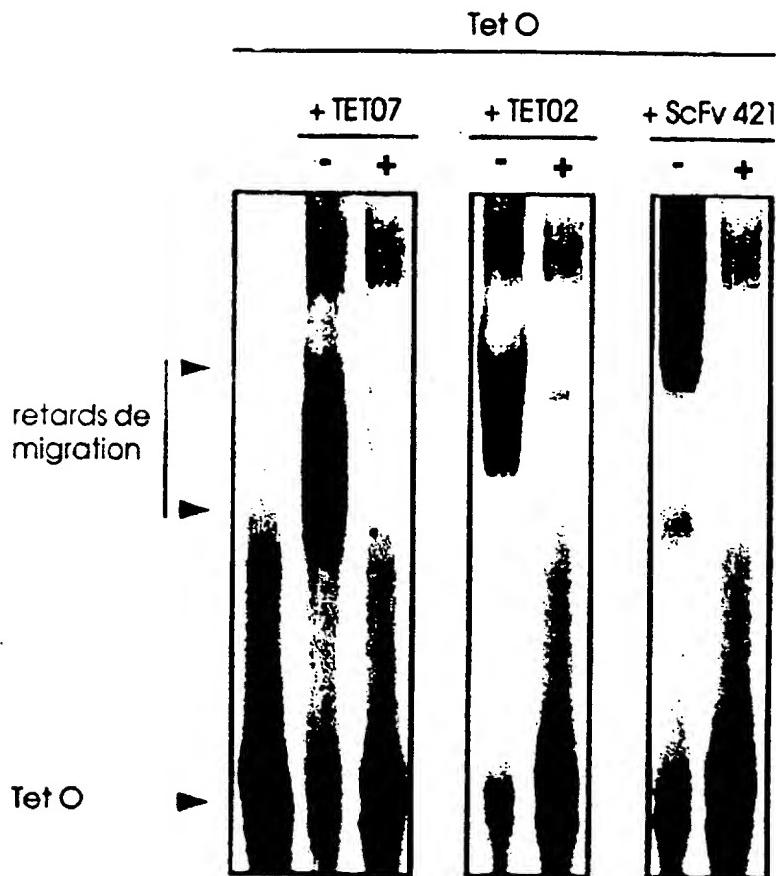


Figure 9

Intéraction entre les molécules hybrides de l'invention et différentes formes de la protéine p53

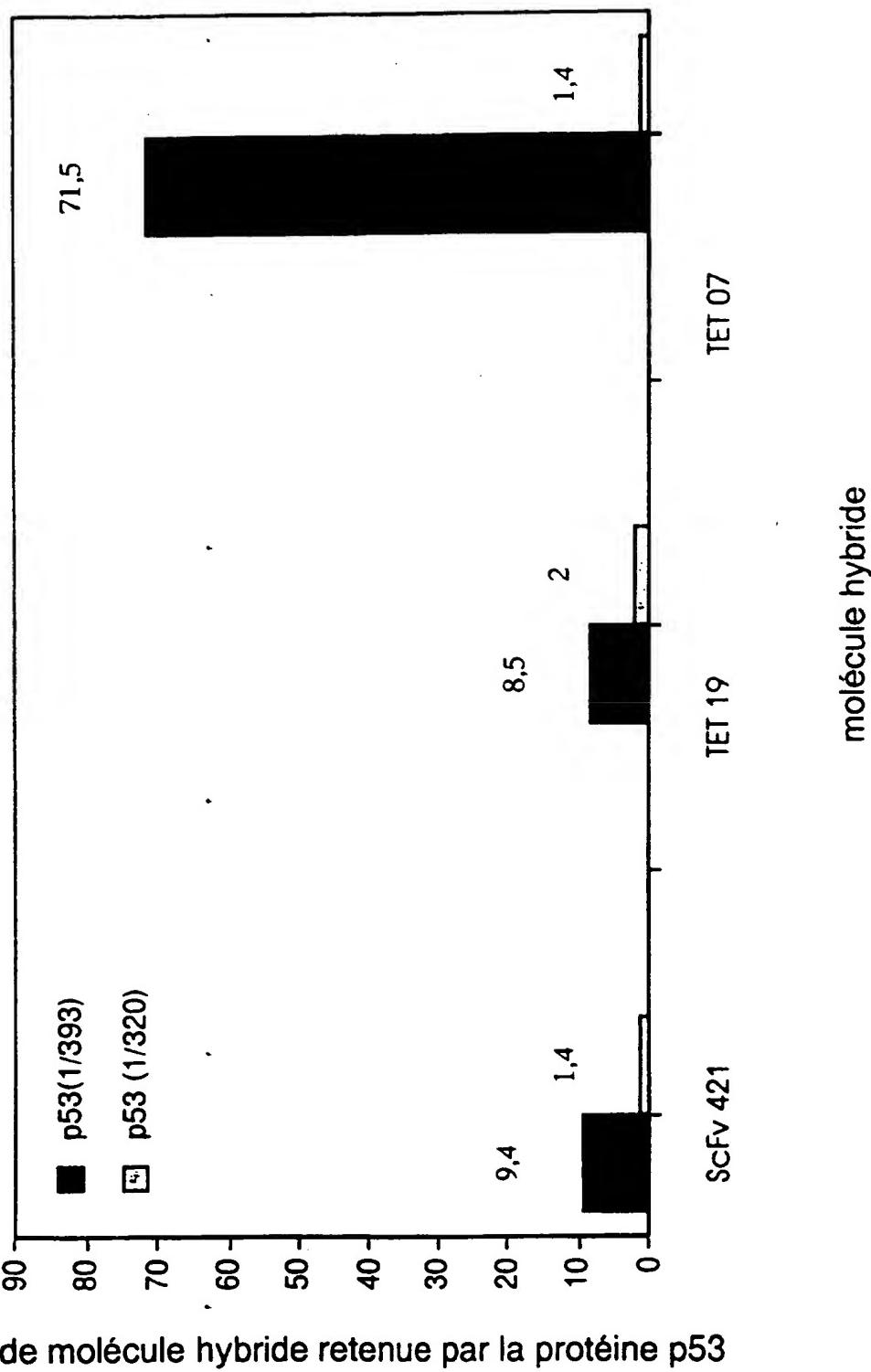


Figure 10

9/10

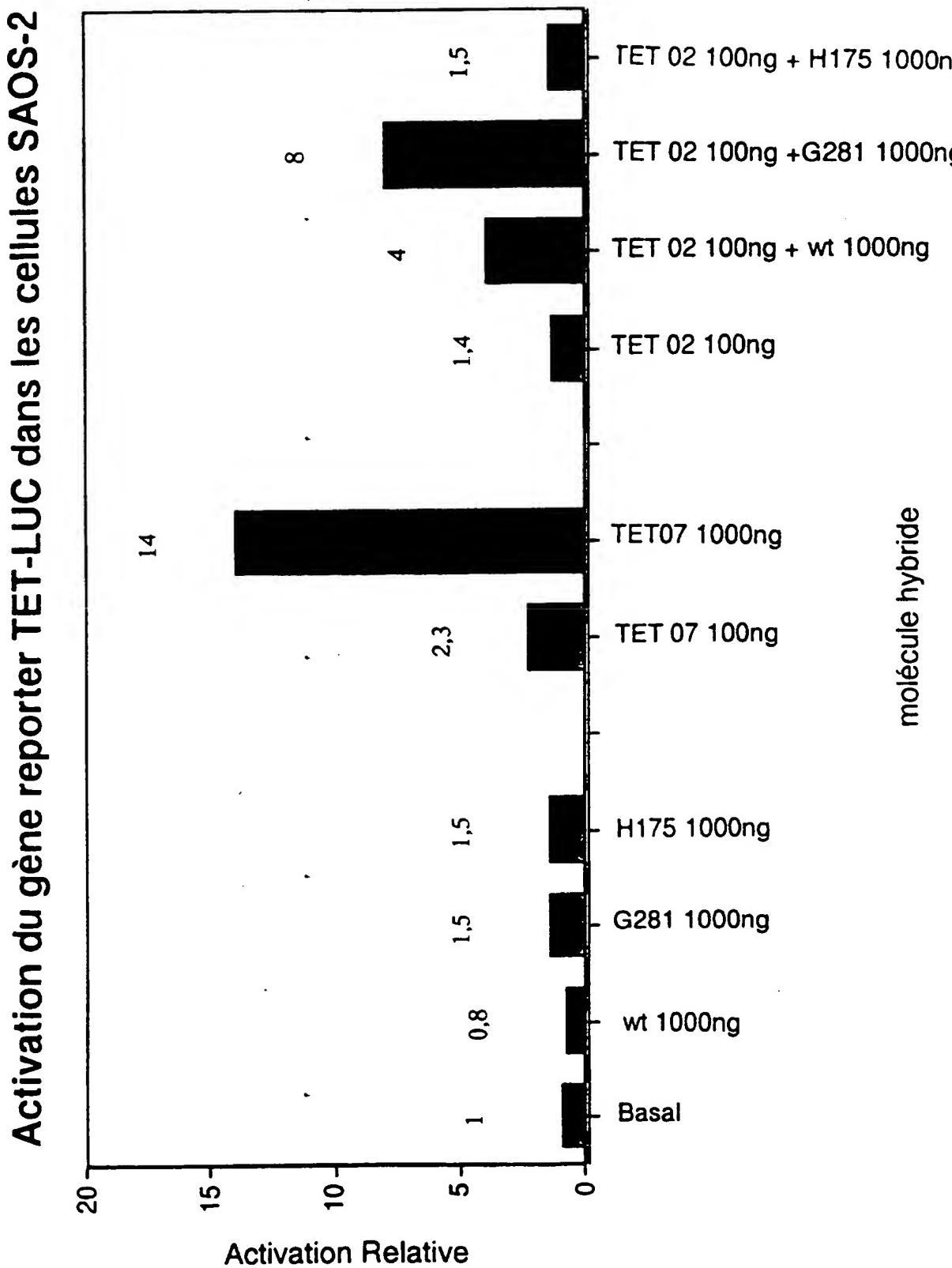


Figure 11

10/10

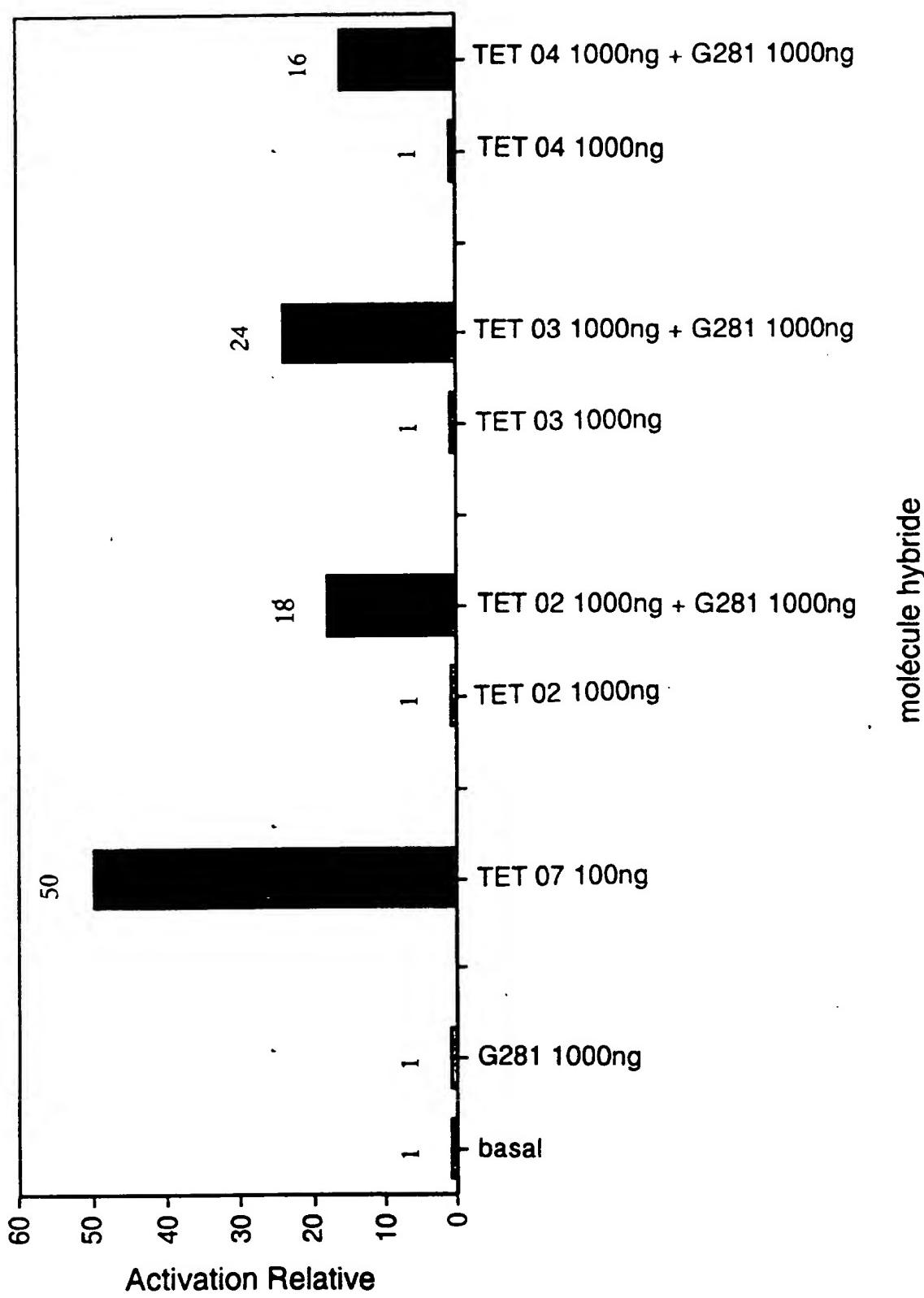
Activation du gène reporter TET-LUC dans les cellules H358

Figure 12

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85
 C12N15/86 C07K14/82 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 29442 (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSEN MANFRED (DE); SALFELD JOCHEN) 22 December 1994	1,2,5-7, 10,11, 13,14, 17, 32-36, 38-43, 45,48,52
Y	see page 12, line 38 - page 13, line 15; claims 1-62 ---	18-25, 46,47
X	SCIENCE, vol. 257, 31 July 1992, AAAS,WASHINGTON,DC,US, pages 680-682, XP002009091 X. YANG ET AL.: "A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system" see the whole document ---	1-3 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 July 1996

Date of mailing of the international search report

29.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FEBS LETTERS, vol. 357, no. 2,3, January 1995, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 221-226, XP002009092 B. CHAUDHURI ET AL.: "The interaction between the catalytic A subunit of calcineurin and its autoinhibitory domain, in the yeast two-hybrid system, is disrupted by cyclosporin A and FK506" see page 223, left-hand column, line 33 - page 224, left-hand column, line 20</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3
Y	<p>CELL, vol. 71, 27 November 1992, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US; pages 875-886, XP002009093 T.R. RUPP ET AL.: "Regulation of the specific DNA binding function of p53" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	18-25
Y	<p>WO,A,90 07936 (CHIRON CORP) 26 July 1990 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	46,47
Y	<p>WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ; LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 June 1994 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	18-25
A	<p>WO,A,94 04672 (DNX CORP ; BYRNE GUERARD (US)) 3 March 1994 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-57
A	<p>SCIENCE, vol. 256, 8 May 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 827-830, XP002009094 S.E. KERN ET AL.: "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-57
A	<p>GENES & DEVELOPMENT, vol. 7, no. 12b, December 1993, CSH LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, pages 2556-2564, XP002009095 N.P. PAVLETICH ET AL.: "The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots" cited in the application see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-57
1 A	<p>WO,A,95 07981 (RHONE POULENC RORER SA ; SCHWEIGHOFER FABIEN (FR); TOCQUE BRUNO (F) 23 March 1995 see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-57
	-/--	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,96 01313 (BUJARD HERMANN ;GOSSEN MANFRED (US)) 18 January 1996 see page 15, line 9 - line 26 -----	1-3

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B-	7108194	03-01-95
		CA-A-	2165162	22-12-94
		EP-A-	0705334	10-04-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9007936	26-07-90	CA-A-	2047363	19-01-93
		EP-A-	0454781	06-11-91
		JP-T-	4504843	27-08-92
		PT-B-	92931	29-03-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9412202	09-06-94	AU-B-	5533194	22-06-94
		CA-A-	2150265	09-06-94
		EP-A-	0675729	11-10-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B-	5099393	15-03-94
		CA-A-	2143326	03-03-94
		EP-A-	0665883	09-08-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9507981	23-03-95	FR-A-	2710074	24-03-95
		AU-B-	6724794	03-04-95
		CA-A-	2169938	23-03-95
		EP-A-	0719328	03-07-96
		FI-A-	961202	14-03-96
		NO-A-	960965	08-03-96
		ZA-A-	9407059	18-05-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9601313	18-01-96	AU-B-	3092395	25-01-96
-----	-----	-----	-----	-----

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	CIB 6 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85
	C12N15/86 C07K14/82 A61K31/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,94 29442 (BASF AG ;BUJARD HERMANN (DE); GOSSEN MANFRED (DE); SALFELD JOCHEN) 22 Décembre 1994	1,2,5-7, 10,11, 13,14, 17, 32-36, 38-43, 45,48,52
Y	voir page 12, ligne 38 - page 13, ligne 15; revendications 1-62 ---	18-25, 46,47
X	SCIENCE, vol. 257, 31 Juillet 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 680-682, XP002009091 X. YANG ET AL.: "A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system" voir le document en entier ---	1-3 -/-

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 'A' document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23 Juillet 1996

29.07.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FEBS LETTERS, vol. 357, no. 2,3, Janvier 1995, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 221-226, XP002009092 B. CHAUDHURI ET AL.: "The interaction between the catalytic A subunit of calcineurin and its autoinhibitory domain, in the yeast two-hybrid system, is disrupted by cyclosporin A and FK506" voir page 223, colonne de gauche, ligne 33 - page 224, colonne de gauche, ligne 20 ---	1-3
Y	CELL, vol. 71, 27 Novembre 1992, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US; pages 875-886, XP002009093 T.R. RUPP ET AL.: "Regulation of the specific DNA binding function of p53" voir le document en entier ---	18-25
Y	WO,A,90 07936 (CHIRON CORP) 26 Juillet 1990 voir le document en entier ---	46,47
Y	WO,A,94 12202 (UNIV DUNDEE ; LANE DAVID PHILIP (GB); HUPP THEODORE ROBERT (GB)) 9 Juin 1994 voir le document en entier ---	18-25
A	WO,A,94 04672 (DNX CORP ; BYRNE GUERARD (US)) 3 Mars 1994 voir le document en entier ---	1-57
A	SCIENCE, vol. 256, 8 Mai 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US, pages 827-830, XP002009094 S.E. KERN ET AL.: "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression" voir le document en entier ---	1-57
A	GENES & DEVELOPMENT, vol. 7, no. 12b, Décembre 1993, CSH LABORATORY PRESS, NEW YORK, US. pages 2556-2564, XP002009095 N.P. PAVLETICH ET AL.: "The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-57
1 2	A WO,A,95 07981 (RHONE POULENC RORER SA ; SCHWEIGHOFFER FABIEN (FR); TOCQUE BRUNO (F) 23 Mars 1995 voir le document en entier ---	1-57

-/-

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO,A,96 01313 (BUJARD HERMANN ;GOSSEN MANFRED (US)) 18 Janvier 1996 voir page 15, ligne 9 - ligne 26 -----	1-3

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9429442	22-12-94	AU-B- CA-A- EP-A-	7108194 2165162 0705334	03-01-95 22-12-94 10-04-96
WO-A-9007936	26-07-90	CA-A- EP-A- JP-T- PT-B-	2047363 0454781 4504843 92931	19-01-93 06-11-91 27-08-92 29-03-96
WO-A-9412202	09-06-94	AU-B- CA-A- EP-A-	5533194 2150265 0675729	22-06-94 09-06-94 11-10-95
WO-A-9404672	03-03-94	AU-B- CA-A- EP-A-	5099393 2143326 0665883	15-03-94 03-03-94 09-08-95
WO-A-9507981	23-03-95	FR-A- AU-B- CA-A- EP-A- FI-A- NO-A- ZA-A-	2710074 6724794 2169938 0719328 961202 960965 9407059	24-03-95 03-04-95 23-03-95 03-07-96 14-03-96 08-03-96 18-05-95
WO-A-9601313	18-01-96	AU-B-	3092395	25-01-96